(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-503455

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)4月13日

(51) Int.Cl. ⁴	離別記号	庁内整理番号	FΙ			
A61K 35/12	ADU	7431-4C				
31/70		9454-4C				
48/00		8314-4C				
		8314-4C	A 6 1 K	37/ 02		
		8314-4C		37/ 66		
		審査請求	未請求 予備	審査請求 有	(全 31 頁)	最終頁に続く
(21) 出願番号	特願平5-507903		(71)出顧人	、サン ディコ	こゴ リージョ	ナル キャンサ
(86) (22)出顧日	平成4年(1992)10	月23日		ー センター	-	
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)4	月25日		アメリカ合発	限国 カリフォ	ルニア 92121,
(86)国際出願番号	PCT/US92	/08999		サン ディコ	ニゴ , スイート	200, サイエ
(87)国際公開番号	WO93/079	0 6		ンス パーク	プロード 30	99
(87) 国際公開日	平成5年(1993)4	月29日	(72)発明者	f ソポル, ロ/	ィートィー・	
(31)優先權主張番号	781, 356			アメリカ合類	茂国 カリフォ	ルニア 92037,
(32)優先日	1991年10月25日			ラ ホヤ, ラ	ラ ホヤ ハー	モサ アベニュ
(33)優先権主張国	米国(US)			- 5673		
(31) 優先権主張番号	863, 641		(72)発明者	・ ゲイジ, フレ	ノッド エイチ	•
(32) 優先日	1992年4月3日		1	アメリカ合領	ア国 カリフォ	ルニア 92037,
(33)優先権主張国	米国(US)			ラ ホヤ, ナ	カミニート へ	レーチョ 8388
			(74)代理人	、 弁理士 山本	Þ 秀策	
						最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌のリンホカイン遺伝子療法

(57)【要約】

腫瘍の免疫療法の新規な方法を記載する。この免疫療法は、サイトカイン遺伝子産物の分泌を引き起こし、腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を刺激する細胞の遺伝的改変を包含する。1つの実施態様では、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された自己の終維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、腫瘍性抗原を伴う製剤形態で被験体を免疫処置するために使用する。別の実施態様では、少なくとも1種の関係性抗原生産物を発現し、そして少なくとも1種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を免疫処置する製剤形態で使用する。

請求の颠囲

- 1. 被験体の癌を処置する方法であって、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子取物を発現するように遺伝的に改変されたCB細胞を含有する製剤形態で、活性腫瘍部位以外の部位において、譲被験体を免疫処置することにより、癌に対する譲被験体の免疫応答を刺激する工程を包含する、方法。
- 2. 前記被験体からあらかじめ単難された腫瘍細胞が、前記機瘍性抗原を提供する、請求項1に記載の方法。
- 3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-5、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。
- 4. 1 種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキンー2 である、額水項3に記載の方法。
- 5. CE細胞を生虚するために、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が組換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。
- 6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ペクター中に存在する、請求項5に記載の方法。
- 7. 前記発現ベクターが、自殺遺伝子をすらに含有する、 績水項6 に記載の方法。

射よびガンマインターフュロンからなる群から選択される、 請求項1 1 に記載の組収物。

- 13. 1後のサイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2である、請求項12に記載の組取物。
- 14. 各サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに 十分であるが、実質的な全身的悪性を避けるのには十分に低 いレベルで発現される、請求項し1に記載の組成物。
- 15. 前記形質導入の工程において、前記レトロウイルス 発現ペクターが、1L-1の特殊分泌を引き起こすプロモーター を有する、請求項9に記載の方法。
- 16. 前記レトロウイルス発現ペクターが、10日または それ以上の期間、少なくとも4単位/日の1L-2の分泌を引き 起こす、請求項15に記載の方法。

- 8. 前記CE細胞が、線維芽細胞および抗原提示細胞から生成される、請求項 5 に配載の方法。
 - 9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であって:
 - a) 旅放験体から線維芽細胞を単離する工程;
 - b) インピトロで、該線維芽細胞を培養する工程;
- c) レトロウイルス発現ベクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腫瘍性抗原をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ベクターを用いて、該線維芽細胞を形質導入して、該線維芽細胞により、該腫瘍性抗原を発現し、そして、該 IL-2を発現および分泌する工程; および
- d) 活性腫瘍部位以外の部位において、免疫吃否を高めるのに十分であるが、実質的な会身的毒性を避けるのに十分に低いレベルで11-1を発現し、そして抜雌媒性抗原を発現する接線機界細胞を用いて、接接験体を免疫処置する工程、

モ包含する、方法。

- 10. 解記線維芽細胞が、自殺遺伝子を発現するように、 * らに改変される、糖水項9 に記載の方法。
- 11. 離瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、線組成物が、腫瘍性抗原、および、少なくとも1種のサイトカイン遺伝子密物を発現するように遺伝的に改変されたCE細胞を含有する、組成物。
- 12. 前紀サイトカイン遺伝子が、インターロイキンー1、 インターロイキンー2、インターロイキンー3、インターロ イキンー4、インターロイキンー5、インターロイキンー6、

明相中

感のリンホカイン遺伝子療法

登景

本出版は、1991年5月25日に出版された米国特許出願第07/720.872号の一部継続出版である199.1年10月28日に出題された米国特許出版第07/781.255号の一部継続出版である。岡出歴と6本明無事中に、今後が採用されている。

免疫系の生物学の我々の理解における近年の進歩は、テイトカイン(1-3)と呼ばれる免疫応答の重要なモジュレーターを同定するに至った。リンパ球により虚生される免疫系モジュレーターが、リンホカインと名付けられており、サイトカインのサブセットのことである。これらの腹剤は、抗腫瘍性免疫に関与する多くの免疫応答を媒介する。数種のこれらのサイトカインが、起換えDNA法により生産され、それらの抗腫感効果について評価されてきた。リンホカインおよび関連する免疫モジュレーターの投与は、種々の新生物を伴う放験体に、目的の健療応答を引き起こす(4-7)。しかしながら、現在の役式でのサイトカイン投与は、これらの異剤の治療上の価値を限定する番性をしばしば伴う。

例えば、インターロイキンー 2 (IL-2)は、抗腫瘍性免疫の 獲得において重要なリンホカインである(4)。 腫瘍性抗原に対 する応答で、ヘルパー T 細胞と名付けられるリンパ球のサブ セットが、小量のIL-2を分泌する。このIL-2は、腫瘍性抗原 刺激部位で局所的に作用して、全身的な難瘍細胞破壊を媒介 する細胞障害性 T細胞およびナチュラルキラー細胞を活性化する。 11-12の静脈内、リンパ管内および病巣内投与は、数名の癌患者に臨床的に置大な応答を引き起こした(4-5)。 しかしながら、散しい毒性(低血圧およびアデノーマ(adesa))により、静脈内およびリンパ管内 11-1投与の投与量および効能が制限される(5-7)。全身的に投与されたリンホカインの毒性は、これらの裏剤が局所的な細胞の相互作用を採介し、そして過常非常に小量しか分泌されないので驚くべきものではない。

さらに、インターロイキン-4(iL-4)、アルファインターフェロン(α-INP)およびガンマインターフェロン(γ-INP)のような他のサイトカインが、腹痛細胞に対する免疫応答を刺激するために使用されてきた。 IL-2と同様に、現在の様式での投与は、不利な副作用を有する。

全身的サイトカイン投与の毒性を回避するために、機人かの研究者が、IL-2の病果内注入を研究した。このアプローチは、全身的IL-2投与に関係する毒性を排除する(8.9.10)。しかしながら、多数回の病果内注入には、治療効能を最適化することが要求される(9.10)。従って、多くの被験体に対して、特に、死亡する可能性を伴わずに注人が健康部位に到途できない場合、これらの注入は実用的でない。

代替的なアプローチは、腫瘍細胞中へのサイトカイン遺伝子の転移を包含し、数種の動物腫瘍モデルで重大な抗腫瘍性免疫応答を引き起こした(11-14)。これらの研究では、同系の審主に移植された場合、サイトカイン遺伝子の腫瘍細胞中へ

の転移に続くサイトカイン遺伝子座物の発現は、サイトカイン分泌腫瘍細胞の腫瘍形成性を停止させた。 IL-1(11,11)、フーIRP(13)またはインターロイキン-4(1L-4)(14)に対する遺伝子の転移は、いくつかの異なる組織学的タイプのネズミの腫瘍の成長を、類替に減少させたかまたは排除した。 IL-1遺伝子転移を用いる研究において、処置された動物はまた、全身的な抗腫瘍性免疫を選得し、改変されていない観腫瘍による以後の腫瘍性の文章に対して保護された(11,11)。 非改変観腫瘍細胞と、 IL-2遺伝子を発現するように設計された遺伝的に改変された腫瘍細胞との混合を用いて、免疫処置を行い腫瘍成長の類似の阻害および防御免疫もまた証明された。 これらの動物腫瘍の研究では、局所的なリンホカインの転移遺伝子の発現に関係する毒性は、全く報告されていない(11-14)。

上記の遺伝子転移処理は、抗腫療性免疫を提供することが示されたが、未だ実用上の困難を有している。 ほとんどの被験体の腫瘍がインビトロでの増殖のために樹立されておらず、ヒトのインビボでの遺伝子転移の方法も使用され得ないので、機能を有するサイトカイン遺伝子を、多数の被験体の腫瘍細胞中に転移できないことにより、このアプローチは制限される。

発明の要反

本発明は、新規で、より実用的なサイトカインの癌免疫治療の方法を示す。 あるアプローチでは、例えば、日常的な皮

膚バイオプシーから得られる蘇維芽細胞のような被験体由来の選択された細胞が、遺伝的に改変されて、1程またはそれ以上のサイトカインを発現する。または、マクロファージ、単球およびリンパ球のような、通常は免疫系において抗原提示細胞として働き得る被験体の細胞もまた、1程またはそれ以上のサイトカインを発現するように遺伝的に改変され得る。以後、これらの改変細胞を、サイトカイン発現細胞、またはCE細胞と呼ぶ。次いで、このCE細胞を、例えば、照射腫瘍細胞の形態で、または精膜された天然または組換え腫瘍性抗原の形態で、被験体の腫瘍性抗原と混合し、例えば皮下法のな、免疫処置において使用して、全身的な抗腫瘍性免疫を誘発する。

サイトカインは、活性腫瘍部位以外の部位での局所的な免疫処置により、全身的な抗腫瘍性免疫患者を誘発しまたは高めるのに十分なレベルで、局所的に発現される。サイトカイン投与に関係する全身的な考性は、起こらない。なぜなら、、CE細胞により分泌されるサイトカインのレベルは、全身的なサイトカイン濃度に大きく影響しないからである。

CE細胞により分泌されるサイトカインの量は、抗腫瘍性免疫を誘発するには十分であるが、 実質的な全身的毒性を生じさせるよりもずっと少ないので、 このアプローチは、 局所的なサイトカイン投与という長所を提供する。 さらに、 この新規な方法は、 死亡をまねを得る病果内注人の必要性を除く。 さらに、 免疫処量の部位でのサイトカインの連続的な局所的

発現もまた、断眺的なサイトカイン住入と比較して、抗腫瘍性免疫応答を高め得る。この方法はまた、わずらわしい静脈内住入と対照的に、CE細胞を用いる局所的な免疫処置という長所を提供する。この方法はまた、インピトロで腫瘍細胞系を樹立する必要性、および遺伝子をこれらの腫瘍細胞に転移する必要性を排除する。

本発明はまた、サイトカインの島所的な発現の代替法をも 提供し、サイトカインおよび間底性抗原の両方の細胞発現の 遺伝的改変を介して、被験体の腫瘍に対する免疫応答を誘発 しおよび/または高める。本実施態様では、被験体由来の選 択された細胞は、単雌され、モレて、サイトカイン遺伝子、 および腫瘍性抗原もコードする遺伝子を用いて形質導入され る。形質導入細胞を、「キャリアー細胞」と呼ぶ。キャリア ー細胞は、縁維芽細胞、および通常は、マクロファージ、単 球およびリンパ球のような免疫系で抗原提示細胞として働く 細胞を包含し得る。サイトカインおよび腫瘍性抗原の両方を 活発に発現している形質導入細胞が、退択され、活性腫瘍部 位以外の郁位での局所的な免疫処置において使用されて、抗 遺瘍性免疫応答を誘発する。 CE細胞と共に用いた場合と同様 に、キャリアー細胞により分泌されるサイトカインのレベル が、全身的なサイトカイン遺産に有意に影響を与えないので、 これらのキャリアー細胞は実質上の全身的な毒性を生じない。 この代替法となる実施総様は、時に困難である腫瘍のサンプ ルの入手の必要を省くため有利である。しかしながら、キャ

リアー細胞は、局所的な免疫処置において、健康細胞、健康 細胞ホモジェネート、積製健療性抗原、または組換え腫瘍性 抗原と共に使用され得、これによって抗腫瘍性免疫が高めら れる。

さらに、この第2の寅施館様は、第1の実施想様と同じられた この 第2の寅施館様は、第1の実施想様と同じられた サイトカインのレベルが、抗腫瘍性を生じさせるよりは さっかった まないことである。 さらに、第1の食物を生じませるよりは でった でいことである。 さらに、第1の は は に の 類 内 注入の 必要性を を 省 き、 サイトカイン ど トゥ で を 視 現 き せる。この 方法 は ま た 、 題 痛 細胞 の インビト の に 連 税 培 髪を 樹 立 する 必要性 ま が こ し て わ ず ら わ に ら 係 培 軽 を 甘 を む を は し 、 そ ・ リ ァ ー 細 胞 を 用 い る 局 所 的 な 免 使 か う 長 所 の は 供 か で 免 長 の な 免 便 に 、 ・ ・ ・ リ ァ ー 細 胞 を 用 い る 局 所 的 な 免 使 か の 良 所 の は 供 す る 必 質 に 、 ・ ・ ・ リ ァ ー 細 胞 を 用 い る 局 所 的 な 免 使 か こ の 長 の た 負 供 す る 必 配 と い う 長 所 を 損 供 す る 。

これらのアプローチはまた、医療業務の他の分野において、 臨床的に重要な他の抗原に対する免疫応答を誘発しまたは高 める用途を見出し得る。

図面の簡単な説明

図1は、レトロライルスペクターDC/TKIL2、LXSH-IL2、およびLNC1-IL2の核玄図を示す。

図 2 は、ELISAで測定された1回上清サンプルのIL-2平均濃度を示す。上清は、約1.5×10⁴個の半集密的な線程芽細胞の

1 晩培養から採取した。

図3は、形質等人線維芽細胞により分泌された(L-2の生物学的活性を示す。 これは、上滑の3回サンブルと共にインキュペートされた)L-2依存[細胞系への]B-TdRの平均取り込み量を測定することで実証された。上滑は、約1.1×10⁸個の半果木的な経緯芽細胞の1 晩結業から採取された。

図4は、以下の動物間の比較を示す: 10⁸個のCT26腫瘍細胞のみを注入された動物(□): 10⁸個のCT26腫瘍細胞および2×10⁸個の改変されていないBALB/C線線芽細胞を注入した動物(■): 10⁸個のCT26腫瘍細胞および2×10⁸個のIL-2形質導入BALB/C線線芽細胞を注入した動物(●): 10⁸個のCT28腫瘍細胞および1×10⁸個の形質導入BALB/C線線芽細胞を注入した動物(○): 10⁸個の形質導入BALB/C線線芽細胞を注入した動物(○)。 腫瘍の測定値は、各処置罪における4匹の動物の遺瘍の機断値迷の平均虚物である。 (*)は、腫瘍の成長曲線の統計学的に有象な登異(P<0.05)を示す。

図5は、キオマイシンホスホトランスフェラーゼのDMA配列のPCR分析を示す。 レーン 1 ~陽性コントロールpLXSH-R1-IL 2。 レーン 2 から 4 は、ゲノムDMAモテストする; レーン 5 および 6、卵巣のゲノムDMA; レーン 7、陰性コントロール、DMAなし。 舒服、練鵬、および肺のゲノムDMAを用いても関一の結果が得られた(データは示していない)。

図 6 は、腫瘍の定番および発達に対するIL-2改変線類芽細 限の効果を示す。ここでは、5×10⁴個のCT28腫瘍細胞と2×1 0⁶個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目

した。

図7は、風傷の定着および発達に対するiL-1改変線線界細胞の効果を示す。ここでは、5×10⁴個のCT25腫瘍細胞と2×10⁶個の鉄箱芽細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に注目した。

図8 は、腫瘍の定義および発達に対する IL-1改変線維芽細胞の効果を示す。ここでは、1×10⁵個の CT2 6種癌細胞と 2×1 0⁶個の線維芽細胞とを混合して用い、腫瘍の成長速度に注目した。

図9は、理事の定着および発達に対する11-2改変線線券細胞の効果を示す。ここでは、1×10⁵個のCT24態瘍細胞と2×10⁶個の線線券細胞とを混合して用い、各処置群での動物個体に対する態底の発現時間に注目した。

図IOは、加集の定着および発達に対するil-2改変細胞の 効果を示す。ここでは、1×10⁵個の改変されていないCT28と 2×10⁶個のDCTK-IL2改変CT-25**加**素細胞とを混合して用い、1 ×10⁵個のCT26と混合した2×10⁶個のDCTK-IL2改変線維芽細胞 と比較し、健康の成長速度に注目した。

図1 1 は、腫瘍の定着および発達に対する11-2改変細胞の効果を示す。ここでは、1×10⁵値の改変されていないCT26と2×10⁶値のCT26とに混合した2×10⁶値のCT1-11-2改変数数学細胞と比較し、各処世群での動物個体に対する錯瘍の発現時間に注目した。

図1.2 は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長 速度に対するIL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、 5×10⁴個の新鮮な腫瘍細胞を投与する7日前に、2.5×10⁸個 の照射CT24健瘍細胞と混合した2×10⁸個の線維芽細胞を用い て免疫処置した。

図13は、全身的な抗腫病性免疫の誘発および各処屋群での、動物個体に対する腫瘍の発現時間に対するiL-2改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、5×10⁴個の新鮮な腫瘍細胞と投与する7日前に、2.5×10⁵個の限計CT25腫瘍細胞と混合した2×10⁶個の線維芽細胞を用いて免疫処置した。

図1 4 は、全身的な抗腫瘍性免疫の誘発および腫瘍の成長 速度に対する LL-2 改変線維芽細胞の効果を示す。 マウスは、 5×10 4 個の新鮮な腫瘍細胞を没与する 1 4 日前に、2.5×10 8 個の照射 CT 2 6 腫瘍細胞と混合した 2×10 8 圏の線維芽細胞を用いて全体処理した。

図1 5 は、全身的な抗腫病性免疫の誘発および各処置群での動物個体に対する腫瘍の発現時間に対する LL-1改変線維芽細胞の効果を示す。マウスは、5×10⁴個の新鮮な腫瘍細胞を投与する 1 4 日前に、2.5×10⁵個の照射CT24層瘍細胞と混合した 2×10⁶個の線検芽細胞を用いて免疫処置した。

詳細な説明

護瘍免疫療法の新規な方法は、サイトカイン遺伝子療物の 分泌を引き起こし、 遺瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を

刺激する細胞の遺伝的改変を包含すると記載される。本明細 書中で、「遺伝子」は、所望のタンパク質をコードするま々 レオチド配列であると定義される。ある実施超級では、少な くとも1種のサイトカイン遺伝子虚物を分泌するように遺伝 的に改変された自己の尊維芽細胞を、活性腫瘍部位以外の部 位において、被験体を免疫処置するために、雌瘍性抗原を含 有する製剤形態で使用する。 他の実施態様では、 少なくとも 1種の健瘍性抗原遺伝子産物を発現し、そして少なくとも1 種のサイトカイン遺伝子産物を分泌するように遺伝的に改変 された細胞を、活性腫瘍部位以外の部位において、被験体を 免疫処置するために製剤形態で使用する。好適には、サイト カインは、これらのナンパク質を周囲の環境に効果的に分怒 する細胞において発現される。線維芽細胞は、このような細 粒の例である。線線芽細胞および他の細胞は、本明細書中に 後に記載のように、遺伝的に改変され得、1種またはそれ以 上のサイトカインを発現し分泌する。

履審性抗原は、以下を包含するいくつかの方法で提供され 得るが、それらに限定されない: 1) CE細胞に、 腫瘍性抗原を コードする遺伝子で、 形質導入し得る。 次いで、 これらの「 キャリアー細胞」を、 被験体の免疫処置に使用する。 2) 適切 な腫瘍性抗原をコードするクローン化遺伝子配列を、 線維芽 細胞または抗原過示細胞のような細胞中に、 転移し得る。 次 いで、 これらの細胞を、 CE細胞またはキャリアー細胞と混合 し、被験体を免疫処置する。 1) 離瘍性抗原を、 細胞または他 のタイプの細胞中で、超換え処理によりクローン化し得る。 次いで、これらの抗原を検討し、CE細胞および/またはキャ リアー細胞を用いる免疫処置に使用する。 () 随痛性抗原を、 腫瘍細胞から精製し得、CE細胞またはキャリアー細胞を用い て被験体を免疫処置するために使用し得る。 5) 腫瘍細胞を、 被験体の免疫処置のために、風射し得、あるいは機械的に破 砕し得、そしてCE細胞および/またはキャリアー細胞と混合 し得る。

本発明は、以下の工程を包含する: (A)CB細胞またはキャリアー細胞の生産に適切な細胞を単離する工程: (B)サイトカイン遺伝子を単離する工程、またはサイトカイン遺伝子および腫瘍性抗原遺伝子ならびに適切なマーカー遺伝子および/または自教遺伝子を単離する工程: (C)(B)から得た遺伝子を転移し、CE細胞を大力を一細胞を生血をするために、放験体の腫瘍性抗原またはキャリアー細胞を生血を重するために、放験体の腫瘍性抗原の免疫学のサンブルを調製する工程: (2)免疫処置のために腫瘍細胞を脂瘍性抗原の供給尿として用いる場合、その腫瘍細胞の感性の治性力を不活化する工程: および(?)免疫処置用のサンブルを調製する工程: 以発療の場合により対象されたいくつかの実施機械である。しかしながら、当業者に周知のいかなを手段も、これらの工程を連成するために、本発明において使用し得ることが理解される。

(A) CE短胞およびチャリアー制格を生産するための細胞の単離

CE細胞およびキャリアー細胞として使用される細胞は、被 験体の体の種々の位置から選択され得る。例えば、皮膚パン チバイオブシーは、被験体へ最小量で侵入させることにより、 CE細胞の生虚用の線維芽細胞が容易に入手され得る供給原を 提供する。または、これらの線維芽細胞は、腫瘍サンプルの 体から入手され得る。適血由来の細胞は、静脈穿刺、骨ឹឹឹឹឹ の 引、リンパ蛭パイオブシー、または腫瘍サンプルから得られ る。CE細胞またはキャリアー細胞の生度用の他の適切な細胞 は、当業者に周知の手段により単離され得る。 同様に選択され、 モして処理される非自己の細胞もまた、使用され得る。

(B) 遺伝子の単離

非常に多くのサイトカイン遺伝子が、クローン化され、本プロトコルにおける使用に有効である。 [L-2、 7-1 NF および他のサイトカインの遺伝子が、容易に使用され得る (1-5、11-14)。 適切な健嘱性抗原のクローン化遺伝子は、 当該分野で周知の手段により単離される。

ネオマイシン低抗性(Neo[®])のような選択可能なマーカー遺伝子が、容易に人手され得る。選択可能なマーカー遺伝子の組み込みにより、所望の遺伝子を首尾よく受容し、発現した細胞の選択が可能になる。遺伝子転移技術の当業者に周知の他の選択可能なマーカー遺伝子もまた、所望の転移遺伝子を発現するCE細胞またはキャリアー細胞の生産に使用され得る。

「自殺」遺伝子は、免疫応答の刺激後に、選択的に誘導可 館な政死を生じさせるために、CB細胞またはキャリアー細胞 中に組み込まれ得る。単純ヘルペスカイルスのチミジンキナ ーゼ遺伝子(TK)のような遺伝子は、CB細胞またはキャリアー 総敗の鉄御可能な崩壊を引き起こすために使用され得る。CB 細胞またはキャリアー細胞が、もはや有効でなくなった場合、 アシクロビルまたはガンシクロビルのような趣刻が投与され 得る。これらの薬剤はいずれら、TIを発現する細胞を選択的 に殺し、それにより、移植され形質導入された細胞を除去す る。さらに、白段遺伝子は、鉄縄可飲なプロモーターに結合 した非分泌細胞障害性ポリペプチドをコードする遺伝子であ り得る。CE細胞またはキャリアー細胞の崩壊が所望とされる 場合、自殺遺伝子が細胞障害性ポリペプチドの生産を誘導し、 その結果CE細胞またはキャリアー細胞を設すように、プロモ ーターの適切な誘発物質を没与する。 しかしながら、CE細胞 またはキャリアー細胞の崩壊は、必ずしも必要とされるわけ

所望の趙瘍性抗原をコードする遺伝子は、組換え法により クローン化され得る。多数の趙瘍により発現される抗原のコード配列は、多数の披験体に使用され得る。

(C) 遺伝子の転移

培養細胞中に遺伝子を転移するために、非常に多くの方法が、使用され得る(15)。例えば、適切な遺伝子を、ブラスミドまたはレトロウイルスのようなベクター中に挿入し得、 そ

Age to the second

特表平7-503455 (6)

して細胞中に転移し得る。エレクトロポレーション、リポフェクションおよび種々の他の方法が、当該分野で知られており、用いられ得る。

適伝子転移の1つの方法は、以前のヒト違伝子転移の研究において用いられた方法と同様の方法であり、態度浸潤リンパ球(tumor infilirating lyaphocyte)(TiL)を、レトロウイルス遺伝子形質導入により改変し、塩铵酸体に投与した(14)。このレトロウイルス介在遺伝子転移の第1段階の安全性の研究において、TiLを遺伝的に改変して、ネオマイシン抵抗性(Neo*)遺伝子を発現させた。静脈内住人を行った後、ポリメラーゼ連級反応分析では、投与微2ヶ月の間、一貫して循環中に遺伝的に改変された細胞が見出された。感染性レトロウイルスは、これらの被験体中には全く発見されず、そして、遺伝子転移による副作用は、どの被験体中にも見られなかった(14)。これらのレトロワイルスペクターを改変し、ウイルスの変異5、polおよびenv遺伝子の削除によりワイルスの複製を防止した。

レトロウイルスを遺伝子転移に使用する場合。 複製受容能を有するレトロウイルスが、レトロウイルスペクターを生度するために使用されるパッケージング細胞系において、 レトロウイルスペクターおよびウイルス遺伝子配列の間での超換えにより理論的に発生する。 殺々は、 超換えによる複製受容能を有するウイルスの生産が減少したまたは健能されたパッケージング細胞系を使用する。このことから、 被験体細胞を

感染させるのに使用されるすべてのレトロウイルスペクターの上清を、PCRおよび逆転写酵素アッセイのような環境的なアッセイにより、複数受容能を有するウイルスに対しスクリーニングする(16)。さらに、複数受容能を有するウイルスに暗すことが、必ずしも有害であるとは限らない。複数受容能を育するマウスレトロウイルスの多量の接種物を住入した重要の研究において、そのレトロウイルスは、重長数の免疫系により誘致された(17)。複数受容能を有するウイルスに原因する疾病または後遺症は、帰した3年後にはまったく観察されなかった。契約すると、放験体が複数受容能を有するマウスレトロウイルスに曝されることは予期されず、そしてそのように聴されることが、必ずしも有害ではないと思われる(1

(D) 被験体の環痛性抗原または特契組換え腹痛性抗原の免疫 学的サンブルの問題

随寒の関係する抗原を有する腫瘍細胞が、被験体から単腫 される。これらの細胞は、固形感または白血病性腫瘍の一方 に由来する。固形感については、単細胞懸濁液が、パイオブ シー組織の機械的分離および洗浄により作られ得る(18)。

遊血器理察は、末常血液または骨髄から、標準的な方法で 単離され後も(19)。

第二の変型は、腫瘍細胞のホモジェネートの使用である。 このようなホモジェネートは、本発明による刺激があった際 に、被験体の免疫系により認識するのに有用な腫瘍性抗原を

含有し得る。例えば、総数を機械的に破壊することで、あるいは凍結し触解することで作られる非分園細胞ホモジェネート、または、好ましくは濃値レベルの産瘍性抗原を伴うホモ ジェネートの個分が使用され得る。

同様に、例えば免疫沈陽法またはDHA組換え法により得られた精製組織抗原が使用され得る。次いで、精製抗原は、上記のCE細胞および/またはキャリアー細胞と共に免疫処置に使用され、これらの抗原に対する被験体の免疫応答を誘発しまたは高める。

キャリアー細胞を使用する実施診様では、腫瘍性抗原は、 キャリアー細胞による発現中ずっと使用され得る。 これらの キャリアー細胞は、単独で、または、他の腫瘍性抗原調契物 またはCE細胞と共に住入され得る。 同様に、CE細胞が用いられる場合は、当該分野で周知の方法で生成された精製組換え 腫瘍性抗原が使用され得る。

自己の膣瘍細胞が容易に人手され得なければ、異種の腫瘍 細胞、 それらのホモジェネート、 それらの精製抗原、または そのような抗原を発現しているキャリアー細胞が使用され得 る。

(以下余白)

(E) <u>健康細胞の不活性化</u>

生存可能な健康知能を、腫瘍性抗原の供給減として免疫処理に使用する場合、健康部能は、被験体中で増殖しないように不活性化され得る。不活性化は、いくつかの方法で連成され得る。確認は、免疫処理の前に照射され得る(18)。この照射は、それらの複製を阻止するレベルであり得る。次いで、このような生存可能な細胞は、それらの腫瘍性抗原を、被験体の免疫系に透供し得るが、新しい腫瘍を形成するほどには嫌疑し得ない。

または、培養され得る腫瘍細胞は、自教遺伝子を形質導入され得る。上記のように、単純ヘルペスチミジンキナーゼ(TI)のような遺伝子を、腫瘍細胞に転移し、アシクロビルまたはガンシクロビルの投与により、それらの頭歯を関係し得る。免疫処理の後、TIQ、環環病細胞は、それらの腫瘍性抗原を提供し得、増殖し得る。被験体の免疫応答が刺激される期間の後、この細胞は選択的に吸され得る。おそらく、このアプローチは、免疫処理に使用される腫瘍細胞をより長く生存させる。そして、このことは、抗腫瘍性免疫を誘導しまたは高めることに有利である。

(F) 免疫処置のための試料の調製

CE知問および/またはキャリアー細胞および腫瘍細胞、および/または腫瘍細胞のホモジェネートおよび/または精製腫瘍性抗原、を患者の免疫処理のために結合する。約107個の腫瘍細胞が必要とされる。腫瘍細胞のホモジェネート、また

特表平7-503455 (7)

實施與[

照計履察細胞と混合した (1.~2を発現する鉄維芽細胞による免疫処置

1) IL-2分泌CB細胞の生産に使用する

自己の鉄維芽田別の単龍

皮膚パンチパイオブシーを、裏面条件下で各被験体から得る。そのパイオブシー組織を細断し、10%のウシ胎児血清を含有する RPNI 1840 培地(または概似の培地)中に入れ、培養において皮膚線維芽細胞の収及を樹立する。この培養線維芽細胞は、レトロウイルス介在 IL-2途伝子転移により IL-2分泌 CB部 胞を生産するために使用する。

2)レトロウイルスペクターの原製

およびIL-I分泌CE細胞の生成

次いで、培養皮膚線維芽細胞を、IL-2およびキオマイシン 抵抗性(Beo®) 遠伝子を含有するレトロウイルスペクターに感 染きせる。Reo® 遠伝子を含有するN1ペクターを使用し、この ペクターは、これまで多数の研究者により、ヒトモ既材とする研究(Li)を含み、インビトロおよびインビボの研究に使用 されてきた。このIL-2ペクターは、N1由来のペクターである、 Priedmannおよびその共同研究者により開発され記載されたし LRNLから生成される(20)。それは、LLRNLのルンフェラーゼ遺 伝子を、ヒトIL-2をコードする完全長のcDNAと種換すること

は腫瘍性抗尿の特別または非積製面分を用いるとき、腫瘍の用量を、10⁷個の未処理の腫瘍細胞で通常存在する腫瘍性抗原の正常数に基づいて調整し得る。腫瘍の関製は、治療を妨げる実質的に全身的な悪性を生ずることなく、抗腫瘍免疫性(11-12)を閉起するサイトカインのレベルを分泌するのに十分な時のCEまたはキャリアー細胞を混合すべきである。

サイトカインは、CE細胞またはキャリアー細胞により、免疫応答を誘起または増大するのに十分であるが、実質的に全身的な毒性を避けるのには十分ではないレベルで、生成されるべきである。これにより、サイトカインの生理学的レベルより大きい従来の方法の投与により生じる副作用を防ぐ。

これらの混合物、および単独で使用されるキャリアー細胞は、注入のために、当該分野で既知であって、免疫処置に受容可能な、どのような機式にも製剤され得る。少なくともCE 細胞およびキャリアー細胞が、生存可能であることが重要なので、この製剤は細胞の生存に適合しなければならない。製剤は、皮下注射、筋内注射され得、または免疫処置に受容可能ないかなる様式の注入もなされ得る。

免疫応答を望ましくない抗原に集中させ得る調製物中の特 染物質は、免疫処理の前に除去しなければならない。

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施機様の説明のために提供するもので、本発明の証囲を限定するものと解すべまではない。

で作られる。 汚染性で複製受容能を育するウイルスを含まないレトロウイルスペクターを、ペクターブラスミド構築物をヘルパーフリーパッケージング細胞系PA317中にトランスフェクトすることで生産する。被験体細胞の感染の前に、このペクターが、ヘルパーウイルスを含まないことが示される。ヘルパーウイルスが検出される場合、そのペクターを、ウイルスのgagalよびpol遺伝子がenvから離れているQP+envAll1パッケージング細路系中で生産し、ヘルパーウイルス生産の可能性もちらに減少させる。

1)形質導入プロトコル

将要始原線維芽細胞を、(20)に記載のように、バッケージング細胞系由来の上演と共にインキュベートする。 これらの細胞由来の上演を、外来性因子および複製受容能を有するウイルスについて、(16)に記載のように試験し、 表1 に概要を示す。 この線維芽細胞を、洗浄し、次いで0118(まオマイシン類似物)を含有する培地中で増離させ、 Nec®遺伝子を発現している形質等人細胞を選別した。 このG418抵抗性細胞を、固相酵素免疫測定法(ELISA)により培養の上海中のIL-2の濃度を剥定することで、[L-2遺伝子の免現について試験する(12)。 IL-2を発現しているG418抵抗性(resillent)細胞は、 -70℃で、以後、免疫処置に使用するために必要になるまで貯蔵する。

表:

外来性因子自よび安全性試験

1.無菌度

2.マイコプラズマ

1.一般的安全性

4.ウイルス試験

LCMウイルス 胸駅因子(Thysic agent)

S+/L-xeno

S+/L- sapho

STS增幅 .

MRC-1/Vero

4) 無射機瘍細胞の類製

臨床的に示唆される外科的な切除から、または浅リンパ節または皮膚転移から得られた腫瘍を、2~8mmの細片に細断し、コラーゲナーゼおよびDITアーゼで処理し、単細胞懸測放中への腫瘍の分離を容易にした。集めた細胞を、適心分離し、BPM11640増加中で洗浄し、次いで、10%のソメテルスルホキンドおよび50%のウン胎児血液を、RPM11640増加中に含有する溶液中で凍結保存する。これらの細胞は、投与のときまで液体窒素中に貯蔵する。皮下免疫処置において使用する前に、これらの細胞を、解凍し、免疫原性性染物質を含まない増加中で

洗浄し、そして、センクム照射値置中で、4,000ラド/分、総線量20,000ラドの照射をした。

1) 独践体の選択

被験体は、組織学的に確認された感の診断を有する。 治療の目的で切除する必要のある腫瘍、または、バイオブシーが容易に接近し得る腫瘍を有する被験体は、本発明の本実施態様に最も適切である。

6)処置前評価

以下の処置前評価を、実施した。

- 1) 疾病の活動度の記載および定量化を包含する病歴および身体検査。
 - 2)動作の状態の評価(Performance Statum Assessment)
 - 0 正常、無症状
 - 1 * 制限あり、しかし、通院可
 - 2 覚醒時の\$0\$以上、起床きている、自動能力あり
 - 3 覚醒時の505以上、ペッドまたは椅子から離れない 限定された自動能力
 - 4 夜たきり

3) 処置前實験

分園でのCBC(CBC with differencial)、血小板数、PT、PT T、グルコース、BUB、クレアチニン、塩解質、SGOT、SGPT、 LDR、アルカリホスファターゼ、ビリルビン、尿酸、カルシウ

8)最終の処方

各被験体は、照射腫瘍細胞とに1-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の雑様芽細胞CE細胞との配合物を用いる皮下免疫処震を受ける。約10⁷個の腫瘍細胞を、組織母養において、半果密的な場合少なくとも20単位/mlの | L-2を分泌することが知られている | C⁷個の雑様芽細胞と混合する(12)。この照射腫瘍細胞および遺伝的に改変された練稚芽細胞を、免疫処置のために、最終容積が0.2mlになるように通常生理食塩水に入れる。

1)投与量の開放

2 週間難して、解計匯痛細胞、および、1L-2を分泌するように遺伝的に改変された自己の線維芽細胞を用いて、少なくとも2 回の皮下免疫処置を施す。 尋性がまったく 観察されなければ、引続き、退加免疫処置を定期的(少なくとも1 週間難して)に施し、抗腫瘍性免疫の答を最適化し得る。

1) 設在的毒性の処置

これらの免疫処置から、有毒な制作用が起こることは予想されない。しかしながら、これらの免疫処置の潜在的な制作用は、以下の様式で処置可能である:

大量の腫瘍細胞溶解が起これば、その結果起こる尿酸ネフロパシー、成人呼吸促進症検群、汎発性血管内凝固症検群またはカリウム過剰血症は、 領郷的な方法により処置される。

ム、ベタンパク質アルブミン。

4)他の分析:

尿分析

CHea、CaおよびCi血液操体レベル、

来着血液β細胞およびT細胞サブセットの免疫表現型分析(i mannophenotypiag)

末梢血液細胞における検出可能な複製受容能を有するウイルスに対するアッセイ

Neo[®]、 IL-2およびウイルス enyについての、 京積血液白血 球の PCR アッセイ

5)他の処置前評価:

類部X線および、コンピューター連動断層撮影(CT)、磁気 共鳴回像法(MRI)または放射性情報スキャンを包含する他の診断的研究を、疾病の活動の程度を記録し、定量化するために 客僚し得る。

これらの評価に続いて、一定の間隔(約1~8月毎)で、治療の過程中に行う評価が、治療および潜在的な毒性に対する応答を制定することに有用であり、その評価により、強される免疫処理の回数が顕著される。

1)並立療法の制限

この処置の効果を最良にするために、 抜験体は、 免疫系を 抑制することが知られている並立療法を受けるべきではない。

免疫処置の部位の局所的毒性は、局所ステロイドおよび/または適切と思われる注入部位の外科的な切除で処置される。 思寒、発熱および/または発疹のような過敏反応は、対症療法的に、解熱薬がよび抗ヒスタミン剤を用いて処置される。 酸酸体は、予防炎を用いて処置されるべきではない。 関節症、リンパ節症または脊機能不全が起こった場合、コルテコステロイドおよび/または抗ヒスタミン剤での処置を始める。 アナフィラキシーは、エピネフリン、液体、およびステロイドの投与のような保障的手段により処置される。

(以下余白)

実施到11

A. 鉄維井田覧中でのレトロウイルス11-2環伝子転移お よび発現

マウスおよび初代ヒト線維芽細胞中でIL-2およびネオマイ シンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を転移して発現するの に、レトロウイルスペクターを使用した。Gliboaおよび共同 研究者らによって生成されたレトロウイルスペクターDC/TKI L2(Gansbacher 6、 J. Exp. Med., 172:1817-1223, 1990、 これは 本明細書中に参考として提用されている)を利用して動物腫瘍 モデルにおいて適用するためにマウス級維芽細胞に形質導入 した(以下のB項を参照のこと)。ヒト蘇維芽細胞を、レト ロウイルスペクターLXSH-RI-IL2を用いて形質導入した。これ らのレトロウイルスペクターの構造の概略図を図1に示す。 LXSN-RI-IL1ペクターのより完全な記述を、そのまクレオチド 民列を含めて、実施例111台よび表2、3台よび4に示す。

上記のペクターを用いた感染およびネオマイシン類似体Ci 18を含有する増殖培地中での2~3週間の選択に続いて、Ba lb/cおよびヒト線體芽胎児培養上液を採取し、そして固相餅 素免疫倒定法(ELISA)によって、il-2についてテストした。図 2 は、形質導入された鉄維芽細胞により分泌された!L-1のレ ベルを養す。

これらの結果は、ルシフェラーゼまたはβーガラクトシダ ーゼのような不適切な遺伝子を発現するN2由来レトロウイル スペクターで感染したネガティブコントロールの線維芽細胞、 および収入ヒト緑維芽細胞を用いた研究を用いて確認しほる。 形質導入したヒト線維芽細胞により発現した!L-1の生物型 的活性を、IL-2依存性T細胞系を使用した細胞増殖パイオアッ セイによって確認した。このアッセイでは、形質導入した娘 維幸細胞およびコントロールの未改変の線機芽細胞からの上 液を、IL-2依存性T細胞系CTLL-2と共にインキュペートした。 細胞増殖および[L-2活性の指標として³E-チョジンの取り込み

B. 動物腫瘍モダルにおける形質導入した線維芽細胞の効力

を測定した(図8)。

11-1を分泌するように遺伝学的に改変した線維芽細胞の効 力を結構機の動物モデルでテストした。これらの研究におい て、Balb/c CT16種集細胞系を、形質導入して(L-1を発現する Raib/e與維芽細胞とともに皮下注射した。コントロール難は、 1) CT28履集細胞および未改変維維芽細胞の混合物; 2) 線 推芽細胞を含まないCT28腫瘍細胞; および3)形質導入され た蜻蜓芽細胞単独を注射した動物を含有した。形質導入線構 芽細胞およびCT26細路で処理した動物の8分の8で腫瘍が検 出まれなかった。これとは対照的に、CT26産瘍細胞を注射さ れた全てのコントロール動物(8/8)は、触診でわかるほどの屋 痛を発達させた。CT26腫瘍細胞を含まない形質導入線維芽細 態を接種した動物では、腫瘍は検出されなかった。[L-2分泌 線維芽細胞を注射したBalb/cマウスにおける平均CT26腫瘍サ イズは、コントロール群と比べてかなり小さかった(図4)。

多夜量非母数統計手法(Koziolら、Blometries 17:383-390,1 981 28 & Of Englot 6. Computer Prog. Blowed. 19:89-74, 1984. これらは本明細書中で参考として採用されている)を利用して、 処理群中の腫瘍増殖の違いを評価した。図4に示す4つの処 理群に対する腫瘍増殖曲線は、有意に異なっていた(p=0.048)。続いて行った処理群間の比較は、腫瘍の増殖においてCT2 4階等回数だけを注射した動物と2×10⁴個の形質導入線線芽細 胞およびCT24腫瘍細胞で処理した動物との間に有意な相違(p (0.05)を示した(図4)。

寒瓶例]]]

A. 計画の概要

豚のリンホカイン遺伝子治療は、通常の治療に失敗した感 患者において評価される。 ネオマイシンホスホトランスフェ ラーゼ遺伝子を含有するM2由来レトロウイルスペクターを用 いる。このペクターは、最近のヒト被験者を用いた定評ある 研究を含むインビトロおよびインビがでの研究について、多 くの研究者によって使用してきた(Rosenbergら、M. Eng. J. Me d., 323:570-578, 1890)。本研究で用いられるリンホカインベ クターは、Xilierらによって開発され記載されている、 F2由 来ベクター、LKSNから生成される(Millerら、Mol. Cell Blo 1.8:2895,1986# & UMiller S. BioTochniques 7:480,1989) これらの文献は本明細書中で参考として援用されている。 ベ クターLXSN-Ri-IL2は、レトロウイルス5'LTRプロモーターの

制御下でヒト(L-1 cDNAを、そして5740プロモーター制御下で キオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含有する (図1を参照のこと)。正常のヒトは-1リーダー配列を、ラッ トインスリンおよびヒトIL-2リーダー配列を含有するキョラ 配列で置き換えた(表2、3、および4を参照のこと)。こ のキメラリーダー配列は、il-2遺伝子の発現を高める。

LXSH-R1-IL2ペクターを構築するために、完全長IL-2 cDHA およびキメラリーダー配列を含有する細菌プラス L ドpBC12/ CMV/IL2(Culten, B. R., DNA 7:845-650, 1988, 本明細書中で参考 として援用されている)を、 Hindiliで切断し、そして末端を Klenovポリメラーゼを用いて平滑化した。 (L-2 cDMAを、続い てBantiを用いた切断によりプラスミドから切り難した。 LL-2フラグメントを、13アガロースゲル中で電気放動により精製 し、そして裏切なパンドを、ガラスパウダー法を利用して抽 出した。簡単にはゲルスライスを55°で4M Naiに熔解した。 室温にまで冷却した後、4μ1の酸化シリカ溶液(B10-101.La Jolla,CA)を添加して、DNAを吸着した。次いで、シリカを、 TE疑例波中で0.1% MaClを含有するEOXエタノールの冷熔液で 洗浄した。DNAを、蒸留水中で55°で加熱することによりシリ カから辞出した。次いで、精製il-2 cDNAを、pLXSMベクター のNoal-Banklクローニング部位に関方向に連結した。piXSN-RI-ILIベクターおよびその部分的ヌクレオチド配列のより完 全な記載を、表2、3、4、5、および8に示す。

```
酵 农 (*川桝粉
         1位から6365位までのLASK-R1-IL2の記載
                                                                        Aatl
                                                                                        21 1961, 2481
                                                                        Aat2
                                                                                       2] 811, 6295
     塩茶
                                                                                       1) 4252
                     モロニーマウス肉腫ウイルスfilti
1-589
                                                                                 ( 19] 392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3064, 3807, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5418, 5931, 6263
                     送長したパッケージングシグナルの配列
659-1658
                                                                                       5] 808, 2685, 3860, 5910, 6292
                      +メラリーダー配列を有するIL-2 cDNA
1469-2151
                                                                                ( 13] 260, 273, 328, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
                     16-24メラリーダー配列
      1469-1718
      1647-1718
                     シグナルペプチドのコード領域
                                                                                       4] 34, 1064, 1985, 3446
                                                                       A£12
      1719-2151
                     成熟リレースコード配列
                                                                       ACLI
                                                                                  [ 2] 1592, 4480
                     No su肉腫サイルス末端/SY40開始
1158-2159
                                                                       Aba 1
                                                                                [ 20] 161, 237, 473, 474, 602, 789, 2889, 2889, 3578, 3653, 3888, 3889, 4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907
                      サルウイルス(の) 超プロモーター
                      サルウイルスDNA末端/Ta5 DNA腎始
                                                                                       5] 808, 2685, 3860, 5910, 6292
2521-2522
                                                                        Aha2
                                                                                       3] 5239, 5258, 5950
                                                                       Aha 3
1557-3351
                                                                                [ 33] 29, 33, 119, 190, 411, 654, 734, 742, 1470, 1486, 1751, 1935, 2001, 2446, 2500, 2791, 3249, 3441, 3445, 3532, 3607, 3826, 4069, 4122, 4141, 4422, 4648, 4738, 4784, 5041, 5562, 5662, 5725
                                                                       Alul
                      Tas DMA末端ノモロニーマウス白血病ウ
2370-3371
3411-4004
                      モロニーマウス白血病ウイルス3゚LTR
                                                                       Alwi
                                                                                2529, 2553, 2864, 2929, 3110, 4027, 3041, 5127, 5128, 5225, 5226, 5689, 6006, 6010
                      モロニーマウス白血病 DXA末端/pBR111
4073-4074
                                                                       Alwn1
                                                                                       4] 231, 3572, 3647, 4896
                                                                                  t
                      プラスミド骨格
4074-6165
                                                                                  ſ
                                                                                       2]
                                                                                              847, 1076
                                                                                       19] 323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
                                                 (以下余白)
                                                                                       2] 2787, 5595
                                                                                  ι
                                                                                       4] 1717, 4295, 4794, 6040
                                                                        ApaLl
                                                                                  ſ
```

```
22] 315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1295, 1325, 1526, 1536, 1558, 1530, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4642
                                                                                                           BapRi
                                                                                                                                   3] 5200, 6208, 6313
Apyl
                                                                                                            BopM1
                                                                                                                                   4] 1501, 2500, 2572, 2953
                                                                                                            Bes82
                                                                                                                                   43
                                                                                                                                           392,
                                                                                                                                                      443, 3082, 3807
                                241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
Agu l
                                                                                                            BetE2
                                                                                                                                          1145
                                                                                                                                   11
                                                                                                                                  22] 315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1293, 1323, 1526, 1536, 1558, 1630, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4642
                                                                                                            BetNl
Asp700
                               476.
Asp718
                                                                                                                        [ 19] 392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3064, 3807, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 6263
                                                                                                            BatUl
AspAl
                       1] 1145
Asul
             040, 756, 826, 839, 1043, 1254, 1277,
1332, 1649, 1201, 3341, 13586, 3616, 3661,
1676, 1689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511,
5733, 6349
                                                                                                                                1] 2060
                                                                                                                          1
                                                                                                            BstX1
                                                                                                                        ( 11] 2010, 2152, 2521, 2856, 3102, 5121, 5132, 5218, 5230, 5998, 6015
                                                                                                            BstY1
               [ 6] 241, 472, 1998, 3821, 3854, 3887
Aval
                                                                                                                                   2] 847, 1076
                                                                                                            Bsu36I
                                                                                                                           Į.
             ( 13] 260, 273, 128, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
Ava2
                                                                                                            Ccrl
                                                                                                                                  1] 1998
                                                                                                                        [ 31] 394, 396, 445, 447, 714, 2679, 2687, 2751, 2758, 3054, 3084, 3084, 31314, 3805, 3811, 3862, 4083, 4186, 4216, 4357, 4390, 4660, 4727, 4827, 5001, 5110, 5503, 5396, 5393, 6265
                                                                                                            Cfol
                       2) 2232, 2304
                [ 2] 1962, 2482
Ave 2
                       3} 658, 1169, 2767
Ball
                                                                                                                        [ 9} 456, 790, 1167, 1188, 2591, 2765, 3156, 3183, $761
                                                                                                            Cfrl
BanEl
                        1] 2152
             ( 9] 318, 476, 1200, 2684, 2719, 3734, 3859, 1891, 5321
                                                                                                                                3] 3004, 3185, 5453
                                                                                                            Cfridi
                                                                                                                          ť
                                                                                                                             29] 169, 200, 245, 260, 273,

756, 826, 839, 1043, 1254, 1277,

12, 1649, 3201, 3541, 3586, 3616, 3661,

16, 3689, 3744, 4041, 5415, 5494, 5511,

13, 6349
                                                                                                            Cfr13I
             [ 8] 413, 426,
3841, 4012
                                                     597, 1583, 3050, 3828,
              { 2} 2688, 1863
Bhe 1
             [ 22] 959, 997, 1738, 2493, 2632, 2758, 2800, 2816, 2909, 3321, 4060, 4131, 4228, 4372, 4390, 4809, 4902, 5108, 5411, 5600, 5802
                                                                                                            Cynl
                                                                                                                                             847, 1076
                                                                                                            Dde1
Bcll
                       1] 2526
                                                                                                                                            95, 1104, 1236, 1421, 1659, 2012, 2528, 2547, 2858, 2936, 3017, 3507, 4021, 5048, 5123, 5134, 5232, 5337, 5678, 5698, 5742, 6053
               ( 2) 2435, 5493
Bgli
              [ 19] 323, 413, 426, 597, 1583, 1721,
2631, 2724, 2788, 2988, 3050, 3739, 3828,
3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
```

```
符表平7-503455 (11)
                [ 3] 5239, 5258, 5950
                [ 4] 328, 1277, 3744, 6349
              [ 9] 656, 790, 1167, 1188, 2591, 2765, 3186, 3183, 5761
               [ 2] 790, 2591
                                                                                                                               [ 30] 161, 237, 473, 601, 643, 789, 2590, 2667, 2689, 2713, 2848, 2938, 3005, 3186, 1578, 3653, 3888, 4016, 4058, 4126, 4160, 4687, 4834, 4860, 5050, 5454, 5468, 5555, 5663, 5907
              [ 13] 260, 273, 328, 626, 756, 1277, 3201, 3676, 3689, 3744, 4041, 5511, 5733
                         2] 790, 2591
                                                                                                                              [ 8] 455, 707, 960, 1580, 4175, 4591, 5169, 5899
                         23
                                 847, 1076
 EcoN1
                        2 3
                                 850, 1450
                                                                                                                              ( 9] 413, 1721, 2798, 2988, 3828, 4300, 4798, 5959, 6044
                                 328, 1277, 3744, 6349
 Zco01091 [
                        43
 EcoR1
                        1)
                                1460
              [ 14] 938, 1037, 1460, 1798, 1805, 1928, 2064, 2121, 2236, 2308, 2400, 5240, 5546.
              { 22] 313, 621, 799, 812, 1225, 1280, 1273, 1291, 1323, 1524, 1514, 1556, 1628, 1294, 2249, 2266, 3070, 3729, 4035, 4506, 4627, 4640
               [ 4] 137, 213, 3554, 3629
                                                                                                                                         11 5914
                                                                                                                 Binc2
                       2) 2232, 2304
                                                                                                                 Bind2
                                                                                                                                         1] 5914
 Pdi2
                       2) 2787, 5595
                                                                                                                                        11
                                                                                                                                                 2498
 Pnu4B1
                                                                                                                              ( 14) 298, 517, 857, 868, 1553, 1814, 3170, 3304, 3356, 3881, 4380, 4455, 4851,
             ( 19] 392, 394, 445, 969, 971, 1193, 2751, 3052, 3084, 3809, 4081, 4083, 4186, 4527, 5108, 5438, 5931, 5263
FnuD2
                                                                                                                              ( 11] 1214, 1240, 1817, 2863, 4102, 4111, 5216, 5443, 5859, 6063, 6100
 Foki
             [ 13] 498, 1198, 1358, 1679, 2333, 2552, 3009, 3034, 3912, 4168, 5339, 5820, 5807
                                                                                                                               [ . 2] 480, 3895
               [ 2] 2787, 5595
                                                                                                                              [ 15] 30, 293, 689, 727, 739, 1452, 1606, 1693, 1963, 2483, 3642, 3709, 4975, 5228, 5563
                { 4} 2688, 3863, 4358, 4728
 Mao 2
             [ 11] 808, 1139, 1180, 1987, 2801, 2988, 4233, 5183, 5599, 5972, 6292
                                                                                                                 Ndel
                                                                                                                                       11 4303
             { 201 38, 1032, 1080, 1145, 1289, 1478, 1706, 2805, 3111, 3450, 4134, 4229, 4836, 4899, 5015, 5298, 5629, 5687, 5840, 6028
 MaeJ
             [ 30, 93, 1102, 1234, 1419, 1657, 2010, 2122, 2521, 2526, 2545, 2856, 2934, 3015, 3024, 3102, 3505, 4019, 5046, 5121, 5132, 5140, 5218, 5230, 5335, 5675, 5694, 5740, 5998, 6015, 6051
Mbol
                                                                                                                 Mbel
                                                                                                                                         31
                                                                                                                                                    29, 1605, 3441
             [ 17] 444, 1145, 1356, 1575, 1617, 1908, 1911, 3046, 2256, 3336, 4351, 5142, 5213, 5968, 6046, 6155, 6351
                                                                                                                             ( 28) 153, 246, 262, 320, 478, 758, 827, 959, 1202, 1279, 2154, 2200, 2272, 2686, 2721, 3678, 3736, 3861, 3893, 4042, 4512, 4551, 5323, 5417, 5438, 5669, 6259
             [ 54] 291, 444, 508, 534, 560, 841, 939, 1227, 1310, 1363, 1369, 1372, 1378, 1408, 1411, 1426, 1433, 1449, 1599, 1620, 1909, 1921, 2412, 2418, 2443, 2449, 2455, 2458, 2470, 2508, 2335, 2399, 2735, 3092, 2326, 3707, 3889, 3078, 3223, 3948, 3974, 4054, 4054, 4057, 4117, 4379, 4587, 4662, 4911, 5311, 5392, 5540, 5746, 6339
Mnll
                                                                                                                              [ 2] 2232, 2304
                                                                                                                Neil
                                                                                                                Nsp(7524)1( 8) 1596, 1835, 1856, 2230, 2302, 1090, 4119, 4484
             [ 22] 35, 1065, 1177, 1207, 1231, 1801, 1843, 1956, 1971, 2124, 2139, 3447, 4261, 5186, 3238, 5243, 5257, 5310, 5545, 5584, 5549, 6321
                                                                                                                Hep(7524)2[ 19] 323, 413, 426, 597, 1583, 1721, 2631, 2724, 2798, 2988, 3050, 3739, 3828, 3841, 4012, 4300, 4798, 5959, 6044
Hee 1
                                                                                                                             [ 12] 119, 190, 1751, 2158, 2791, 3532, 3607, 3989, 4192, 4822, 5067, 6008
Xep 1
             { 30} 161, 237, 473, 601, 643, 2550, 2667, 2689, 2717, 2848, 2938, 3005, 3188, 3378, 3653, 3888, 4016, 4038, 4126, 4180, 4887, 4834, 4860, 5050, 5454, 5488, 3555, 3665, 5907
                                                                                                                             [ 8] 1596, 1835, 1836, 2230, 2302, 3090,
                                                                                                                PagR7I
                                                                                                                               ٠.
                                                                                                                                        1] 1998
Mst1
                        21 2787, 5595
Hst2
                      2)
                                847, 1076
             [ 22] 315, 623, 801, 814, 1227, 1252, 1275, 1295, 1325, 1526, 1556, 1558, 1630, 2196, 2251, 2268, 3072, 3731, 4038, 4508, 4629, 4642
                                                                                                                Plel
                                                                                                                                        73
                                                                                                                                                  865, 1547, 3350, 3889, 4374, 4859,
               ľ
                        1) 3187
                      2] 2685, 3860
                                                                                                                PpuHl
                                                                                                                               ſ
                                                                                                                                                  328, 1277, 3744
                                                                                                                                                  331, 1280, 3747, 6352
             [ 20] 161, 237, 473, 474, 602, 789, 2689, 2849, 3578, 3653, 3888, 3889, 4017, 4059, 4126, 4161, 4860, 5556, 5907
                                                                                                                                                 987, 1163, 1888, 2511, 2738, 5618
              { 2] 2389, 3117
```

特表平7-503455 (13)

			+11		112				
			211						
	-1		7						
11		11			111-		+	*	
*· I		1		*1		*	+		
			[[+[[2+-[[+]		·				

> MATERIAL PROPERTY OF THE PROPE

キャナインン セスホトランスフェルー代 - MAY97 原状態 シテナル 10-56363 IT. IRMS 021). | 1279 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 125 | 12

Ş

(P) (P) (P)

1から6365まで、1位からの番号。

M) CV

14-563653七、1位中与小路沙。

The state of the

1から6365まで、1位からの番号。

| LAINING | LAIN

(2) (E)

1から6365まで、1位からの番号。

| MANY | K. M. | MANY |

1から6365まで、1位からの参考。

| 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (14) | 15 (

THE SAFET SAFET STREETER ASSOCIATE TO SECULATION OCCUPIES OF SAFET STREETER ASSOCIATE TOWNSOCIAT GOVERNMENT ASSOCIATE TOWNSOCIAT ASSOCIATE TOWNSOCIAT ASSOCIATE TOWNSOCIAT ASSOCIATE TOWNSOCIATE ASSOCIATE ASSOCIATE TOWNSOCIATE ASSOCIATE ASSOCIATE ASSOCIATE TOWNSOCIATE ASSOCIATE ASSOCIATE TOWNSOCIATE ASSOCIATE ASSOCIATED ASSOCIATED TOWNSOCIATE ASSOCIATED ASSOCIATE

PRO (MA)

PRODUCTION OF THE PROPERTY CONCIDENCY CONCIDE

PAGES

PEGES

PE

#Cvn1	表6(歳を)
>nest spini spinite	·
810 840 870 380 800 910	PRACE PERENT PRACE PEREN
COCCACUTA GUALOGRAF CHATGGEA TOCACCON TOLAGRATATA TOUTTOTGET ACABRACAS	1170 1140 1140 1140 1170 1140 1190
OCCITICACT COTTCCCTCA CCTACACCTT ACCOTOCOCC ADTCCTATAC ACCAACACCA TECTCTCCTC	CCAUCTACAG TICTTCTOTE CAACCAATG GAACAGGAGA GOTCTTACGG CAACCATTAA CGTCCGAAGG CCAUCTACAG TICTTCTOTE CAACCAATG GAACAGGAGA GOTCTTACGG STTCGAAATT GCAGCCTAGG
>Aqs1	
720 120 140 150 160 170 180	oned oned problem
ANOCIMAND METOCOCCE TOCCICIONA TITITOCTIT COCCITIONA COCAMOCOCC GOUGETTOSC	1200 1910 1220 1230 1240 1250 1250
ALOGUELING ACTIVICATION VOCCYGINESS PRIVIOCHIY COCCYVIOLES GOCLEGIOCO COCCYGINCING	COCCEANANT OCXCENTRAL CONSESSION RECOCCION TRANSPECIA SOFTETITE OCTOGOCCOS SOCCENTES CONCEANATE CONTENENS TRANSPORTED ANTENTANTE CONSEANANCE OCACOCCOS
>7+11	
. [990 1000 1010 1820 1010 1040 1050	>Perl
POCTUCASCA TOUTTOTOTO TTOUCTOTO STCACTOTO STCTOTATES STCTUARABLE SACGREEA	>ors2
ACCRECATED ACCRECACE RECEIVES SECURICAL ARCACATARA CAGACTITTA ATOCCECAT	>\$600).091
	>Ppull >rraill >ftyl
	>TRAILE
·	ATOGRAPHIC AGRICAGOST COCTRACTOS PRACTICOGA AGCUTTOGGT TITURCCCOR CICCUTOGGT
	INCLLINE ELIGIBEER CCUVALIVE VILLENVER LECTIVERY VIVILLECON CYCOLOGY
	>Resi
	1340 1358 1368 1376 1380 1390 1400
bheet	CLACCOUTTY STACATOCTA ACCUTOCOCCE POSTCTTOCT CCATOCOCCE GOTTTOTACCE
>See1	STTCCCCAAA CATOTOCCAT TCCCACCCCC ACCACAACAACA SCTACCCCCC CCAACCTCCAA
scrat	
Hist3	
>Beu36I	
PASES PROMPES	
1040] 1070]1040 1090 1100 3128 1320	
CACANTOCIC POCETIANCE TECNOCITING CHECACTICIAN AGAINSTOCK GOCAFCOCKÉ ACAACCASTO CACANTOCIC AGGULATICA AACTOCAASE CACICACTE TCTACAGCTC GOCTACOCKÁ TOTICOTCÁS	·
	>Ecost >Ecost
rctr1	3410 2420 3430 1440 1410 1410 1410
>kepki >Easi >Easi	OUTCOTTONA COCCOCION ASSOCICCUTT TATOCHOCON TRACTICUTTO TOTACOCROS AASTOCTTM
	CCADCALOCT OCCORDING TAGUADCCAA ATROSTOCOG RGTCROCAMO AGAITCCOCCE TTAACCAATO
送る(疑る) - PBogna PPonh	夜名(練き)
	PAGES PAGES
1400 1400 1500 1510 1520 1530 1540	PATES 1910 1920 1930 1940 1956 (1960
1440 1490 1500 1510 1520 1530 1540	PAGES PAGES
1400 1400 1500 1510 1520 1530 1540	PACIAL PACIAL CONTROL OF THE STATE OF THE ST
1480 1490 1500 1510 1520 1130 1540 CTTOSTALOT GACGACTAC ACTOSCAMA CATCAGCAM CACCTATETA CTCTCCAGG TOGGCCTGGG GAACCATTCA CYGGTGCAM PLACECTING STAGTGGTTG GTGCATACAT GACAGTGCC ACCOCCAGGG PAGE 1 ***PEFE1**	DEBAL PAGE 1 1900 1910 1910 1930 1140 1955 1940 GETABLAGA AGACTICAL CONTROLOGO MATOCHAM THIROCTICAL ACCAMAGE TICACTIMA CAGACCTIC TOTTGAGTIT GEAGACOTOC TICACENTA MATGGGGT TOCTTTTGA AGGGGATTG NAVAL
1480 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTOSTANCT GACGACTAC MOTOGRAMS CATCADCAMS CARGTATETA CTCTCCAMS TOGGCTCOG EMACCATTCA CTCSTCAM PENCECTING STANSFORT GTCCATACAT GACAMOTOCC ACCORDANGE PResi PRepi PRepi	DEBAL PAGE 1 1700 1910 1970 1930 1140 1955 1940 GETABLAGA AGACTICAL CONTROLOGO AMSTOCIAL THIROCTICAL ACCALAGES TICACTTAM CAGASICTICS TOTTGAGITT GOAGACCICC STOLOGASTS MANGGLETT TOUTTTTGA AMSTGLATTO NAVAL PAYEZ NAME
1480	DEBAL PAGE 1 1900 1910 1910 1930 1140 1955 1940 GETABLAGA AGACTICAL CONTROLOGO MATOCHAM THIROCTICAL ACCAMAGE TICACTIMA CAGACCTIC TOTTGAGTIT GEAGACOTOC TICACENTA MATGGGGT TOCTTTTGA AGGGGATTG NAVAL
1480 1490 1500 1510 1520 1520 1540	DETAIL 1 1700 1910 1970 1930 1140 1955 1940 GETABLAGA AGACTCHA COTTOGRAS MATCHAR THIROCTCAR ACCARDACT HICACTTRAS CAGACCTICT TOTTGAGTT GORGACCIOC FICACARTH MATCHART TOUTTTTGA ANGTGARTH NAVEL PAYE2 PROFI PORT
1480 1490 1500 1510 1520 1510 1540	DEBAL PAGE DESCRIPTION ACADETCALA CENTERGRAD AND TOTAL AND ACADAMET PROCESSAR ACADAMETRATED DAVEL PROCESSAR ACADAMETRATE PROCESSAR ACADAMETRATED DAVEL PROCESSAR ACADAMETRATED P
1460 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTOSTANCT GACGACTAC MOTOSTANCE CATCANCAM CALCULATER CTCTCCAMO TOGCCTCOC EMACCATTCA CYCOTCCAMO TEACCETTYO CHARTOSTTC CTCCCAMOTOCC ACCOCCAMO PROST PROST PROST PROSCATO ANCACTCCAM CONTITONO GACGACAGO GACAGAGA ATTICACIO TATTOCTACO MAGGOSTCAM TEACACTCCAM CONTITONO GACGACAGO GACAGAGA ATTICACIO AMAGGATOC	DEBAL PAREL DEVEL DE
1480	DEBAL PACINI 1700 1710 1770 1770 1770 1770 1790 1740 1755 1740 GYCTAGAAGA AGAACTCAAA COTCTORAGA MATRCHAA THTAGCTCAA AGAAAAACT FTCACTTAAG CAGATCTTCT TCTTGAGTTT GGAGACTCC STCACOATT AAACGGAGTT VONTTITTGA AAGTGAATTG PAVEL PAVEL PAVEL PRUM PAGEL
1460 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTOSTANCT GACGACTAC MOTOSTANCE CATCANCAM CALCULATER CTCTCCAMO TOGCCTCOC EMACCATTCA CYCOTCCAMO TEACCETTYO CHARTOSTTC CTCCCAMOTOCC ACCOCCAMO PROST PROST PROST PROSCATO ANCACTCCAM CONTITONO GACGACAGO GACAGAGA ATTICACIO TATTOCTACO MAGGOSTCAM TEACACTCCAM CONTITONO GACGACAGO GACAGAGA ATTICACIO AMAGGATOC	DEBAL PAREL DEVEL DE
1480	PAGES 1700 1910 1970 1930 1740 1955 1950 1960 GTCTARIAGA AGAACTCAAA CENCTORAG MATOCTAAA TITTACCTCAA AGEALAAACT TICACTTAAG CAGATCTTCT TCTTUAGITT GAALACTCA TICACATT AAATGAATT TGGTTITTUA AAATGAATT NAVES PAGES P
1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1540 CHICGIALOT CACCAGGIAC MITCOGNAME CATCAGGAM CAGGIATETA CITCCAGGG TOGGCCTEGG CHACCATTCA CTOCTOCAG PERCECTITO CHACTOGGG COCCAGGAM CAGGIAGATA CAGGIAGAM CAGGIAGAM PROBLEM PROBLEM PROCESTION CHACTOGGAM CAGGIAGAM PROPLET COCCAGGAM PROBLEM PROBLEM PROCESTION CAGGIAGAM CAGGIAGAM PROPLET COCCAGGAM CAGGIAGAM C	PAGE 1700 1910 1920 1930 1140 1955 1740 GETTABLAGA AGAACTGAAA CENTEGROO MATROTHAA TITAGETKAA AGAAAAACT TICAGTTAM CAGATCETCE TETTGAGITT GEAGACTCC STCACGATT AAATGGAGTT FOSTTITTGA AAGTGAATTG NAVAL PAVE2 7AGLI PRUSA PAGES PERGS PERGS PAGES PAGES PERGS PERGS 1 1970 1960 1939 1000 2010 1020 1028 COCTAGGGGG STANICAGGE NATAGENGG MATGTTTCE GEACTTAAAG GACATTGAM COCKAGGGGG STANICAGGT NATAGENGG MATGTTTCE GEACTTAAAG GACATTGAM COCKAGGGGG STANICAGGT NATAGENGG MATGTTTCE GEACTTAAAG GACATTGAM COCKAGGGGG STANICAGGT NATAGENGG GEGGATTTCC GEMAGTTTC TOTAGGAG PAGES PA
1480 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTGGTAAGT CACCAGCTAC MITCGGMAM CATCAGCAG CACCATATATA CTCTCCAGG TOGGCCTGGC EMACCATTCA CTGGTGCANG MICCGCTTTG CTAGTGGTTC CTGCATAGTA CTCCCAGGA TOGGCCTGGC PAGE PROBLE PP101 PP	TATES 1700 1910 1970 1930 1140 1950 1960
1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1540 CHICGIALOT ELOCALOCIAE MITCOIMAE CATEMOLAMS CACCATATETA CITECAGOS TOGGETEGE BACCATTER CTOCTOCKS MITCOIMAE CATEMOLAMS CACCATATETA CITECAGOS TOGGETEGE BACCATTER CTOCTOCKS MITCOIMAE CALCATORY CACCATATETA CITECAGOS TOGGETEGE PRINT PRODUCT PRODUCT 1550 1560 1570 1550 1550 1550 1550 1550 1550 PROCESSATE ANCACTOCKS CONTACTOS CACCATOROS CONTENENT TACATATICS THITOCIACS MAGGOGREMS TOTOCISCO CONTACTOS CACCATOROS CONTENENT TACATATICS THITOCIACS MAGGOGREMS TOTOCISCO CONTACTOS TOCALAÇÃOS COCRETACAT CONCEGNATO EMECACOTO SANTITUDADA CITATORIOS ACACTORIA ACACATOR COCURTOCAT CONCEGNATO EMECACOTO SANTITUDADA CITATORIOS CONTACTOS TOCALAÇÃOS COCURACACITA SOCIETATA SOCIETATA ACACATOR PROCESSOS ACACATORIAS ACACTORIAS ACACATOR COCURACACA ACACATOR CACCATOR CACCATO	PAGE 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1740 1750 1740 1750 1740 1750 1740 1740 1750 1740 1750 1740 1750 1740 1750 1740 1750 1750 1750 1750 1750 1750 1750 175
1480 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTGGTAAGT CACCAGCTAC MITCGGMAM CATCAGCAG CACCATATATA CTCTCCAGG TOGGCCTGGC EMACCATTCA CTGGTGCANG MICCGCTTTG CTAGTGGTTC CTGCATAGTA CTCCCAGGA TOGGCCTGGC PAGE PROBLE PP101 PP	PAGE 1 1910 1910 1920 1930 1140 1956 1940 1940 GRETARIAMA ACAMETRAM ACAMANACE TECATIMA CAGATOTTO TOTTAGATH GRAGOTOC STOCKMATT AMERICAN ACAMANACE TECATIMA CAGATOTTOC TOTTAGATH GRAGOTOC STOCKMATT AMERICAN TOCKTITTOCA AMERICANTOC PAGE 1 1940 1940 1940 1940 1940 1940 1940 19
1480 1490 1500 1510 1520 1520 1520 1540 CTTCOTANCT CACCACCTAC MOTOGRAMA CATCAGOLAG CAGCATRETA CETCEMOR TOGGCCTEGE EMACCATTCA CTOSTCCAR MOTOGRAMA CATCAGOLAG CAGCATRETA CETCEMOR TOGGCCTEGE EMACCATTCA CTOSTCCAR MOTOGRAMA CATCAGOLAG CAGCATRETA CETCEMOR TOGGCCTEGE PRINT PR	PAGE 1700 1910 1920 1930 1140 1956 1940 GYCTAGAAGA ACAACTCAAA CENTROGAOG MATROTHAA TITAGCTAAA ACAAAAAACT TICACTTAAG CAGAICTTCT TETTGAGTIT GEAGACTOC TICACGATT AAATGGAGTY FOOTTITTGA AAGTGAATTG NAVAL NAVAL PAGE PA
PROPRIA PRO	DEPART PAGE 1700 1910 1920 1920 1140 1956 1940
1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1540 CHICGIALAS CACLOCIAC MITCOIMAC CATCADCAMS CACTATETA CITECAGOS TOGGCTEGO CHACCATTCA CTOCTOCAGO PERCECTITO CHACTOCAGO CACCATATETA CITECAGO TOGGCTEGO CHACCATTCA CTOCTOCAGO CACTATORIO CACCATORIO CACCAT	PAGE 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1740 1750 1740 GENTARIAMA ACAMCEMA CENTROMO MATROTIAN TITLACTICAN ACAMANACT TICACTIAN CAGAICITCI TETTRACTIT GENGACCIC STCACCHIT ANAFOLIGIT VOCTTITUCA AMETRACTUR PAGE
THE DATE OF THE PROPERTY OF TH	DETAIL 1700 1910 1920 1930 1140 1955 1740 GENTABLAGA AGAACTCAAA CENTROMOM MATROTHAA TITACTCHAA ACAAAAACT TICACTTAMA CAGATCITCT TETTGAGTIT GENGAGCICC STCACCATT AAATCCATT TOCTTATAGATCA ACAAAAACT TICACTTAMA CAGATCTTCT TETTGAGTIT GENGAGCICC STCACCATT AAATCCACA ACCAAAAAACT TICACTTAMA DAVEL
THE THE TARGET OF THE TOTAL ACCOUNTS CANADAL CONTINUES CANADAL ACCOUNTS AND	PAGE 1700 1710 1710 1710 1710 1710 1700 170
THE PRINT PR	DETAIL 1700 1910 1920 1930 1140 1955 1740 GENTABLAGA AGAACTCAAA CENTROMOM MATROTHAA TITACTCHAA ACAAAAACT TICACTTAMA CAGATCITCT TETTGAGTIT GENGAGCICC STCACCATT AAATCCATT TOCTTATAGATCA ACAAAAACT TICACTTAMA CAGATCTTCT TETTGAGTIT GENGAGCICC STCACCATT AAATCCACA ACCAAAAAACT TICACTTAMA DAVEL
THE THE STATE OF T	PART 1910 1910 1913 1920 1940 1956 1960 GETTAGLAGA ACAMCICAL CETTERION MATRICINA THIRDCTULA MCLANAMACT HICACTIAM CAMBRICTIC TETTERITY COMMITTED ANATOLISTY FORTTHTUS ANGTHATED ANGTHATED PROPERTY PART 1910 1910 1910 1910 1910 1910 1910 191
THE THE TARGET OF THE TOTAL CONTRACT CANADANA CONTRACT TO THE TOTAL AND AND THE THE THE THE TOTAL CONTRACT CANADANA CONTRACT TO THE THE TOTAL CONTRACT CANADANA CANAD	PROTECUTE ANY CONTROL AND ANY
THE STATE OF THE S	PRINT PROPERTY OF A CONTROL AND A CONTROL AN

特表平7-503455 (17)

*#+9{153413 PEM3 >Eco 5 2 1 >2491 2330 2330 2348 2348 2350
THAS TEASTA ACCAPATOR SECRETARIS TOSSOCRATO
AATCAGTEST TOSTATCHOS ECCECATES ACCORDING -2401 mie1 >4 [13 * >52.72 344 Mora. 在6 (競車) >2401 >ing tha >c[r1 2770 *Fep1 PAGEL >T181111 erall steel 209 LAI PREDA PRAYA » Equal 12220

特表平7-503455 (18)

	特 表 平 7-503455 (1)
. 在5(Rē)·	安ち(観点) PHop62
PG/#101	SALUMS Prog2 SEcons
petet	3570 1350 3590 3600 3610 3630 3630
>2001 >Hre1 >He1	GGTAAGCAGT TOUTGOODGS SCTCACGGGE RAGAACAGAT GGAACAGTTG AATATGGGGE AALEAGTES
3140 3130 3140	CCAPTCOTCA ANDARGOGO MANTETOS TICTIGICIA CETTOTOCAC TTATACCOM TITETCOTAT
DOG DOG TIT TOT DEA THE ATE BAD TOT DOG DOG CTO GOT STG GOS GAG GAG CAD TAT DAG GAG ATA COD DOG AAA AGA GOT AMA TAG CTO ACA COD DOG GAG GAG GAG GAG GAG AGA AGA GAT ATA TAT THE TAG GAG AGA GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG	
mly Acq Pho for Sly Pos fie Asp Cys Gly Acq Lou Gly Vol Als Asp Acq Tyr Gla Asp Ilas	
3220 3230 1240 3250 1240 3270 2280	
COO TTO OCT ACC COT SAY ATT SCT CAA CAS CTT COC SEE SAA TOS SET SAG COS TTC CTC STC	palum!
COC AAG OCA TOG SCA CTA TAA COA CTT CTG GAA CCG CCG CTT ACG CGA CTG GAG GAG CAG Ale Lew Ale The Ary Asp lie Ale Giv Giv Giv Giv Giv Fis Try Ale Asp Ary Phe Lew Vely	2640 1650 1666 2670 2680 2670 1708
	TOTOTOGTAL GENETICETO ETCOSCITCA GEOGENAGAA CACATGGTOC CEAGATOCOG TOCAGCOCTO
1270 2100 2111 2220 2120 1240	AGRICATE OFFERMOME SECRECARY DECEMPATE STUTACION SETETAGGOS AGRICAGEM
CTT TAG OUT ATG GGG DAT CCC GAT TOD CAG GGG ATG GGG TTG TAT GGC CTT CTT GAG GAG TTG GAA ATG CCA TAG GGG GTA GGG CTA AGG ETG GGG TAG GGG AAG ATA GGG GAA GAA GTG GTG	>Pest
Les tye dig lie hie hie tre hop der die hee lie his the Typ hee Lee hep die ther	
>Flei	>Eco01012
9785_8KL_8@/_Na-HuLV_DHL_M m	» Pputt
2380 3240 2370 2380 2290 3480 2410 2470	PADEL PEAL PELYS
THE TEA SECCEMENT PRODUCTURE TARRATARIA CATTITATTY ACTORDERS ARRESTORE ARTERNALIS	3730 3720 2730 3750 3750 3760 3770
AND AND CONCESSAND ACCORDANCE ATTITATES CENANATION SCHOOLSES SETTINGCOOK STACTISCES PRO EMAD	AGGACTITOT AGAGAAGGAT GAGATSTITE GAGGETGGG CAAGGACGTG AAATGACGCT GTGGTTATT
	POSTCALACA TOTOTOGIA STETACAME SICCOLOGIC ATTOCTOGIA TITACTOGIA CACOGLADIA
>4/12	» Diech
>Dist	>nq LL1
3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490	>Aqui >arii
COCACCTOTA COTTICOCIA OCTACCTAL OTACCCCAT TOTOCLACCC ATCLUMAT ACATALITCA GCOTGGACAT CCALACCCTT CENTULART CATECOCTA ALACCITCOCI TACTITITA PETATERACT	Straff Straff
	3780 3790 3830 3830 3830 3830 3840
Þáspt2	"TARCTARGE ARTEROTION STICTURETT CHOTOCOCC OCCUPANCION OCCUPANCIACE ATTRANAMOS
>Pre2 >Erol3	- CTTCATTOG TTAGTCANOG EAMALSCOLA EXCARGOGO GEAAGAGEAG GECGTOCHGE TATTTTCFG
3500 3510 3530 2530] 3540 2550] 3540	Plini
GRAPAGARIA ETTERGIPES ACCTECCES EMPLYOCIAE ACCTECATAT COCCUENCES CUATARCTOS ETTATOTOTO CARRECTACT TOCHETOCTS CTCTACRITY TOCHETTATA COCCUENTIOS CETATAGACA	a >Ban2 >Asp718
	>fhei >Plei
	•••
B 8 (RE) Sens Sens	ACCURACIAN CONCINCIAN AND CONCINCIAN
PERMIT THANK THE TANKS THE TANKS THE TERMIT	AGREGATIVE GEROSPITE CONCOCCACE CAPACHEGITE TEACHTAIGN ATMICEMENT STATEGOOD PROCECULAR CONCOCCACE CAPACHEGITE AGRICATION ATMICEMENT STATEGOOD PROCECULAR CONCOCCACE CAPACHEGITE AGRICATION TATACHCOC TAPACHCOCCACA CATACHCOCC
PROBLEM PROBLE	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PROBLEM PROBLE	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PROBATION OF THE PROBAT	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PROBLEM SHOPE AND SHOPE AN	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PRANT TANK TANK TO THE TOTAL TOTAL TOTAL COLOR MANGEMENT CAPTACKER PRANT TANK TANK TANK TOTAL TANK TOTAL TOTAL TOTAL TOTAL COLOR TANK TANK TANK TOTAL TOTAL TOTAL TOTAL TOTAL COLOR TANK TANK TANK TOTAL TOTAL TOTAL TOTAL COLOR TANK TANK TANK TOTAL TOTAL TOTAL TOTAL COLOR TANK TANK TANK TOTAL COLOR TANK TANK TANK TANK TANK TANK TANK TANK	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PROBLEM SHOPE SHOP	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PRODUCTION CONTINUED CONCINCION CONTINUED CONTIN	AGREGATION 4216 4320 4320 4320 4320 4320 4320 4320 4320
PROPERTY AND	AGREGATION 4216 4320 4130 4240 4250 4220 4220 AGREGATION ATTROCTOR CONCENSION TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA GALVALINA CONCENSION CONCENSION CANADAGE ANTICATOR TAXAGGRAFIA CANADAGE AGREGATION CONCENSION CONCEN
PROBLEM SHOPE SHOPE SHOPE SHOPE STREET SHOPE STREET STREET STREET STREET SHOPE STREET STREET SHOPE STREET S	AGREGATION 4216 4320 4120 1240 4350 2140 AGREGATION CONTINUES CONTINUES CONTINUES TRANSPORM TRANSPORM CONTINUES CON
PROPERTY AND	AGREGATION 4216 4320 4120 4200 4210 4210 4210 4210 FORCEUTACH CONCENTRAL CONC
PRODUCTION CONTINUES CONCINCING EXCENDENCE PROCESSES CONTECNED PROPERTY SHAPE	AGREGATIVE COCCOCCACAC CARRACTERS YEARSTANDS ATMICEDATE VARIATIONS PROCECULAR CONTENSION CONCOCCACAC CARRACTERS YEARSTAND ATMICEDATE VARIATIONS PROCECULAR CONCOCCACAC CARRACTERS YEARSTAND ATTOCCACAC CARRACTERS AND CA
PRODUTION CONTINUED AND ADDRESS OF TRAINING PRODUCED CONCINUED CON	AGREGATIVE GEOGRAPH CONCOCCAGE CATACOGRAPH TEACHTRICS ATMACGRAPH VAIANTHOO PROCECULARIA CONCOCCAGAS CENTRAGOGRAPH AGRICATION TATACOCCAGA CATACOGRAPH AGRICATION TATACOCCAGA CATACOCCAGA CONCOCCAGA CONCOCCAGA CATACOCCAGA CATACOCCACAGA CATACOCCACACA CATACOCCACACACACACACACACACACACACACACACAC
PRODUCTION DECEMBRA STRANGER PRODUCTION OF PRODUCTION STRANGERS CONTROLLED CO	AGREGATIVE COCCOCCACAC CARRACTERS YEARSTANDS ATMICEDATE VARIATIONS PROCECULAR CONTENSION CONCOCCACAC CARRACTERS YEARSTAND ATMICEDATE VARIATIONS PROCECULAR CONCOCCACAC CARRACTERS YEARSTAND ATTOCCACAC CARRACTERS AND CA

	特表平7-503455 (1
表6(被告)	26 (級台)
TYPICATAGO CTOCCOCCO CTURCUROLA TURCHARAN CURCULTURA STURRICO COURTAGOOD ARAGOTATU CRITICOLO CULTIFICAD	AGASTEGETA SCHETTGATE COCCANACAA ACCACCOCCO GIAGIOCESTES THITITIOTE TOCAACCAG
4620 8630 4640 4550 4660 4678 4480 ·	PETENACCAL CONCENCING CONTITUTE TOLISCOING CYLOGOCYNG WWWYNYNW PURILLONG
ACACCACTAT ALMATACTA CONTITUTE COTEGUAGET CONTOUTSON STATUTETT CONLOCATION	>Zhaz >Besti
TOTOCTCATA TITCTAFEET COCCUADOS OGACCTTODA CCGAGCACCE CAGMEACAA COCTOGGACE	>60LT1 >Eps1
>84a1	1510 5520 5130 5140 5150 5140 5170
4590 4700 4710 4720 4720 4710 4750	AGATTAGUGG CAGAAAAAA GGATGICAAG AMAFGGTT GATGTTTTGT AGGGGGTGTG AGGCTGAGE PCTAATGGGG GTGTTTTTTT GGTAGAGTTG TTGTAGGAAA GTAGAAAAGA TGGGCCAGAG TGGGAGTGAG
SCHACOOG AFACETTOE SCETTICTOE CTTCSOGRAM COTGGCGCTT TCTCATAGET CACSCTUTAGE SCHATCGCG TATGGACAGE GCALCACGE GAAGCCCTTC GCACGGGAA AGASTATGGA STBGCACATG	
> Ng tal	paeti ** Pinoi Pieti Miraj
>ApeL1(Mend >Sypii +Aphi >Shai NAmi
4160 4175 4160 4790 4600 4610 4820	\$1.00 \$1.00 \$2.00 \$11.0 \$1.20 \$1.20 \$1.00
CENTERACE TECCTION TOSTOCTE CANCETOGGE TOTOTECAGE ACCUSTOS TOCACCOCAL CATAGASTICA ACCUSANCE ASCAMOSIA OTTOTOCOCOCA ACALOUTOS TRANSCOSA ASTACOCOCTO	GRACOMANA CICCOTTANO OCNITITOCI CATCACATTA ICARANAGA TOTTCACCTA GAICOTTANA COTOCOTTATO ANTOCARTO COTAMANCA STATUTANA AGTERITOCI AGRACOGAI CAGGAMANI
CATACASTCA ACCUACION OFFICIACION ACCUACION ACC	
>Pight	>Bral Ang)
THE PROPERTY OF THE PROPERTY SAFETY S	5250 5260 5270 5250 5390 5300 5310
SCENCHOCKE ATMOSCRAT CAPACCAGAS CTCAGGTTGG CCCATTCTGT SCTCALIAGE SCICACOCTE	ARTHAMAN GAMETETIA RECRUCIA METATRICO RETRAMOTE GERERACAST TACCARTOCE
PAINE	STANTITTA CITCUMANT SMITHCANS PCANAMAS SCANTIGAMS CAGACTOTCA APOSTRACIA
14100 4918 1970 4910 4940 4910 4960	>deal >Plei
ERGERATES TRACROCATT RECEGNISCE SCENTETRES COCTOCTACE CLETICITÉS ASTOCTOCOC STEDETERCE ATTECCTAR TOSTETOCT CENTRENTES OCCROSATES CTERRENCE TERRENCES	1220 (5230 5240 5350 5260 (5270 5380
	ATTACTORE CONTRACT TOROGRAPHS CHARACTER ANTERCRIA CAROCACTE ACCOCACTE
TARTACOR TRESTABLE SERVICIATION OCCUPATION ASSESSMENT COTOGRAMA	>8943
ATTEMPORE ANGICATETY CONSTRAINA ACCATAGAGE COMMACCACT PROGRESSES CAMPORTITY	8390 8490 B430 8430 9444 J \$436
	GACADANA COLONIANA AGGARANA COLONIANA CANTOLOGO DAGAGORA CANTOLOGO AGAGORANA CANTOLOGO AGAGORA COLONIANA CANTOLOGO AGAGORA COLONIANA CANTOLOGO AGAGORA COLONIANA CANTOLOGO AGAGORA CANTOLOGO COLONIANA CANTOLOGO AGAGORA AGA
	>=====================================
>0.002	TOLOGOGOTO EMARTTATO RECARTANE ENGINEERS ENGINEERS GOSCINGARIS COTOCONA

·	PRICESCENC CICLIFFERD LOCALIVELES CLOSSICOSC CLACEDOCCA OCCULCACY CONCENCRA
·	ACCOUNTS CONTAINS CONTAINS CONCESSED CONCESSED CONTAINS CONTAINS
•	AUGGGGGA CICIAMING TOTALITY CHORIOGO CITOCOCCT GGGCTCITA COMMACTI
。 既5(能表)	pro (GRA)
死6(純春) Pāgel	
3A101 1530 5540 1550 5540 5170 5180 5550	pa (St.b.) SMinez
>Acel 1920 1940 1950 1940 1970 1980 1990	pt6 (GLB) PHine2 PHind3
TAIGU SIGO SIGO SIGO SIGO SIGO SIGO SIGO SIGO	R6 (68.5) PHINE2 PHINE2
PAREL 1910 1540 1850 1840 5170 5180 5550 CITTATICODE CTCLATELE TOTATIANT STREEDWARD ANGIACATA ACTACTODE CASTIANTA	#6 (SEB) DRICHER DR
SAIGH 1510 1540 15150 1540 5170 5180 5590 GTTTATCOOK CTCATCAST CTTATTAST CTTCCCCCCA ACCTACACTA ACTACTICCC CAGTTASTM GRAATACCCC GRACTACTC ACATACTAST CAGCCCCCT TOTATCTCAT TCATCAMCCC GTCASTTATC PRACE	# 6 (# 8) >Nine Nine
SAIGI 1510 1540 15150 1540 1770 5180 5550 GTTTATCCOC CTCCATCLAT COTATTALT COTCCCCCA ACCTACACTA ACTACTICOC CAGTTALTAG GRAATACCCC GRACTACTC ACATACTATA CAACCCCCT TOTATCTCAT TCATCAACCC GTCAATTATC PRACI >Acct	# 6 (# 8) >Nine Nine
THE TOTAL STATE OF THE TOTAL STA	# 6 (# 8) >Nine Nine
THE TOTAL STATE OF THE TOTAL STA	# 6 (# 8) >Nine Nine
TARES 1510 5540 1510 1540 5170 5180 5550 CTTTATCOCC CTOCAPCLAS TOTATCANT OFTICOCOCCA ACCTACATA ANTACTOCC CASTLAND CAMATACCC CACTACATA ACAMACACCC TOCATCATA TOTACTCAS TOTACTATO PAGES PAGES	PRES (SES) PRESE SES SES SES SES SES SES SES SES SES
THE STATE OF STATE AND STATE OF STATE O	# 6 (# 8) >Nine Nine
THE STATE OF THE S	PAGE (SES) PRINTE PR
THE STATE OF STATE AND STATE AND STATE OF STATE	PAGE (M.S.) PRINCE P
THE STATE OF STATE AND STATE AND STATE OF STATE	PAGE (SES) PRINTE PR
THE STATE OF CHILDREN TOTAL ACCOUNTY TOTAL CONTROL CONTINUES OF THE STATE OF OF THE ST	PRE (SEB) PRINCE PRI
THE STATE OF STATE AND STATE AND STATE STA	PAGE (SES) PRICES PR
THE STATE OF THE PROPERTY OF THE STATE OF TH	PAGE (SEA) PRINTE PR
THE STATE OF STATE AND STATE AND STATE STATE OF	PARPIGO PAR
THE STATE OF THE STATE AND STATE AND STATE STATE OF THE S	PASSION PAS
THE STATE OF STATE AND STATE AND STATE STATE OF	PAGE (RE) PRINCE PRI
THE STATE OF THE STATE AND STATE AND STATE STATE OF THE S	PRES (RE) PRINTE PRI
THE STATE OF THE PROPERTY OF THE STATE OF TH	PAGE (RE) PRINCE PRI

95 pp1 6110

>8+941 - 4310

6220

在6 (報象)

~	ATGAGTA	TENGRADERA	AACTTATAA	TANCTICETA	MATAGEORY TYATCACCOT	ATAMENGACI	ACTOCCCTAL
	4130						
CA1	ATTTCAA	TETATTIAL	MAN TAMACA	AATAGGGGTT	CCCCCACAT	TTCCCCCAAA	AGTCCEACCT
STA	TANKETT	ACATAMIC	TITTATITET	TTATCCCCAA	GGCGCCTGTA	AAGGGGCTTT	TEACOGTGG

284	43							
>Aha3							,	Peel
Pacyl							>244010	19 2
> Maga				1991			**************************************	
		_					•	
	£300		310	6310		•	4 70	6340
					TTARCCTATA AATTOCATAT			
•	•							
TTCN	١.							

LYSORILIZを切除しない信息:

ter3	6413	Clei	fret	201	10071
\pe1	Isal	Brell	R)=L	PELMS	sell
Lau2	I epst2	20047111	Krei	8442	1111
1441		Tenl	man t		

いウイルス力価を有するコロニー (>10⁴感染単位/ml)をテス トした。 最も高いウイルス力価を有するコロニーおよび上記 のIL-1発現物を凍結保存した。そして、これらをLXSN-RI-IL 2レトロウイルスペクター試験を行うためのストック培養物と して利用する。

赛拉例!

レトロウイルスペクターの構築およびサイトカインの発現

形質導入した細胞系によるIL-2の生産を増加させるために、 IL-2発現を進める異なるプロモーターを含有するベクターを 用い、モしてヒトfl-2 cDMAを、インスリン分泌シグナルペプ チド中に顧方向にサブクローンした(17)。 IL-2 cDMAを、LXS N(LTRプロモーター)およびLNCX(CNVプロモーター)ベタター(Dr. A. D. Millerより贈録)の観プラスミド中に順方向にサプク ローンした(14)。LXSN-IL2およびLNCX-IL2と命名した新たに 構袋したペクター(図1)を、レトロウイルスの上情の生産 のためにPAS17細胞系にパッケージした。コントロールとして、 高レベルの発現をする2世コピーペクターDC/TKIL-2ペクター (チミジンキナーゼプロモーター)(Dr. E. Gilbosより贈呈) を比較に用いた。

これらのベクターを、多くのマウス、ヒト、初代および樹 立時胞系に用いた。形質導入した細胞のプールを選択し、そ して10%ウシ胎児血清(FBS)およびネオマイシン類似体である 活性G-418(400μg/sl)を含有するDMEN培地に展開した。 MCR8 およびBalb/c 373細胞系における発現の研究の結果を表7に

LXSN-BI-ILZレトロウイルスペクターを生成するために、1 OマイクログラムのpLXSN-RI-IL1 DNAも、標準的なリン酸カル シウム沈殿法(Millerら、Mol.Cell Blol.8:1895,1988)によっ て外性の(ecotropic)パッケージング細胞系PE501にトランス フェクトした。トランスフェクトしたP2501細胞系を、108PC Sを含むDNEN結婚地中で増殖した。 婚地を24時間後に交換し、 そして24時間後に上清を採取し、上記のように両性の(amp hotropic)パッケージング細胞系PA317に感染させた(Willerら、 Nol. Cell Biol. 6:2895, 1988 to # Miller 6. BloTechniques 7:980,1989)。 感染PA317細胞を、トリプシン処理24時間後 に採取し、そして10%PCSおよびネオマイシン額似体Q418(400 μg/ml)を含有するDMBM中に1:20で再プレートした。細胞を、 7%COa雰囲気下、87℃で増殖した。コロニーが現れるまで選択 培地を5日毎に交換した。14日目に、20コロニーを選択 し、展開し、そして標準的方法(Xuら、Yirology 171:331-34 1.1988)によってクイルス産生物をテストした。 簡単に含えば、 上清を、集密(confluent)培養皿から採取し、0.45μmのフィ ルターを通し、10%PCSを含むDMBMで希釈し、そして#μ g/mjの ポリプレン存在下でNIH 271を感染させるのに利用した。24時 関後、ネオマイシン類似体G418を含有する培養培地中で感染 #1E \$7\$細胞を増殖した。12~14日後、コロニーを染色して計 数し、そしてウイルス力価を上記のようにして計算した(Xu 6、 Virology 171:331-341, 1984).

ノーザンプロット分析によって、IL-2発現について、最も高

ボす。

異なる(L-2ペクターで形質導入 L た線維芽細胞による(L-2発現の比較)

		ng IL-2	[L-2の単位
線維穿細胞	ベクター	/104	田彪/日
マクス	LNCX (コントロー)	u) 0.4 ±50%	<1
	LNCX-IL2	33.7 ±11%	67
	LXSN-IL2	6.6 ± 6%	13
	DC/TKIL-2	1.9 ± 5%	4
4 }	LXSN (コントロー)	v) 0.7 ±29%	1
	LNCX-IL2	159.5 ±17%	319
	LXSN-IL2	25.5 ±15%	51
	DC/TKIL-2	3.0 ±10%	6

(WTEB)

實施例了

レトロウイルス形質導入のための原放芽細胞培養および条件

初代線線学細胞レトロウイルス形質導入体の培養条件を最近化した。初代線線学細胞を貧尾よく培養した。最適条件は、約4~6週間で、12mm²の皮膚生検からの約1~4×10⁶個の初代線線学細胞の増殖を可能にする。遺伝的に改変した線域学細胞のレトロウイルス感染、0(18週択、および展開は、さらに4~6週間かかる。

初代線線祭籍路の遺伝的改変の条件の探索は、最適な形質 導入が以下の手類で得られ得ることを示唆する: 線線穿細胞 を、血清飢餓により、続いて、形質導入の15時間前に15%のウ 少胎児血清を含有する培地を用いて刺激することにより、G1 期に同期化する。次に細胞を、2 サイクルのレトロウイルス 感染させ、各サイクルを約3 時間続けた。細胞を新鮮な培地 で1 映用培養し、次いで翌日、G418中で選択を開始する。本 方法は、感染多量度に依存して、培養物中の5~15%の線維芽 細胞を形質導入し得る。

本手法を用いて、多くの初代および樹立線維芽細胞を形質 導入した。例として、表 8 ではLXSN-ILIを用いて形質導入し た線維芽細胞系におけるIL-Iの発現レベルを比較する。

(以下余白)

丧9

_		
LXSN-IL2で形質 通入	したCT1細胞による[L-2発現におけるG418過度の効果。	

G418	の選択用量	分泌[L-2	ng	/10。细数/日.
25	µg/ml	1.0	±	10%
50	µg/ml	3.0	±	6%
100	µg/ml	15.0	±	5%

*G418遺訳の3週間後。

宴施例刊

来前血液リンパ腺対よび遺伝学的に改変された鉄機芽細胞に よって誘起される11-1発現レベルの比較

遠伝学的に改変された線線等細胞によるil-2の生産を、インビトロで正常ヒト末梢血液リンパ球(nPBL)の刺激によって 連成されたil-2生歳と比較するために、nPBLをFicol-Paque密 改造心分離によって単難し、同種異系nPBL(混合リンパ球培 養、MLC)、または、11nMのホルボール 12-ミリステート 11 - 7セチート (PMA) を加えた、2μMのカルシウムイオノホア ((Ci)(A23187)遊離酸)存在下で培養した。表10に示すよう に、本実験の結果は、PMA/Ci刺激正常T細胞集団におけるil-2発現レベルが2ng/10⁴細胞/24時間であったことを示している。 LXSN-IL2で形質導入した栽培学組施によるIL-2の発現。

投送 李细胞系	ER	起隊	ng IL-2 <u>IL-2の</u> /10 [*] 組数/日	
Balb/c 3TJ	272	形質転換体	6.6 ± 6%	13
MCR9	41	胚	25.5 ±15%	51
NEDY 313	Łŀ	皮膚	25.0 ±10%	50
GT1	Ł٢	皮膚	15.0 : 5%	30

これらの結果は、倒立、胚、および初代線粒芽細胞培養における[L-1の発現レベルが類似していることを示している。表でつったらのデータの比較は、IL-2の発現が、使用した線維芽細胞系上りも、異なるプロモーターのような要因によって、より影響されることを示唆している。 関機に、 塔斐魚件の変化は、IL-2の発現に食要な影響を及ぼし得る。表 9 は、形質導入した071細胞、すなわち刻代ヒト線維芽細胞培養が、25 μ g/sl G418選択下での方が15倍多くのIL-1を発現したことを示している。 いくつかの他の初代線維芽細胞系もまた、本発明者らのベクターで形質導入され、モしてG418選択下で現在増殖している。

これは、本発明者もの最小の生産力を有するベクターである、DC/TXIL-2を用いて形質導入したBalb/c 3T3 線键芽細胞による
LL-2発現レベルと等しい(表 7)。 MLC中でのLL-1発現レベル
は140pg/10⁶細胞/24時間であった。 これはPMA/CI割数培養よ
り低く、おそらくその理由はPMA/CIが非特質的な吃客を誘起
し、一方、MLCが特異的Th割激になるからである。 MLC刺激素
団において、推測した抗原特異的Thの割合を考慮に入れると、
刺激T細胞当たりのLL-2発現レベルは、 両方法で等しくなる。

表 1 0 風かみ銀数によるIL・2分泌レベル。

#G.RS.	分形L-2 pg	/10	·细胞/E
リンパ味 : コントロール (非活性化)		<u>.</u>	50%
コントロール (新位達に) PMA + カルシウム イオノホア	2,000	±	6%
混合リンパ球培養	130	±	90%
形質差人鏡鏡穿粗胞			
MCR9-LXSN-IL2	24,000	ŧ	5%
MCR9-LNCK-IL2	162,000	±	20%
MCR9-DC/TRIL-2	10,000	±	6%

塞施例YII

マラス機像モデルにおける解検芽細胞媒介サイトカイン液伝 子治療

2つの実験のプロトコールを用いて、抗腫瘍免疫の誘導による観報芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の効能を研究した。 第一のプロトコールを、 離瘍移植に対する遺伝学的に改変した線維芽細胞をテストするように設計し、 一方、 第二のプロトコールを、 全身的な抗腫瘍免疫を誘導するように設計した。 各実験の結果は、 2つの図および1つの表に示す。 最初の図では、 各処理群に対する腫瘍の増殖速度を、 ある時間後での群中の平均腫瘍サイズとして示す。 2番目の図では、 カブラン・ノイヤー (Kaplan-Heier) 曲線が、 各処理群において個々の動物に対する腫瘍初期の時期を示す。 各実験についての動物に対する腫瘍初期の時期を示す。 各実験についての動物は、 健康のない動物の数および調合、 および腫瘍サイズ分布パターンを表に示す。

実施例YII(a)

護康移植に対ける顕維芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療の 効器

5×10⁴個のCF25細胞と3×10⁶個の異なるレトロクイルスペクターによって11-3を発現するように遺伝学的に改変された 鉄維芽細胞との混合物を、マクスに皮下注射した。 腫瘍細胞 のみ、または腫瘍細胞と未改皮線維芽細胞との混合物を注射 したコントロールのアームでは、33動物のうち31動物(945)で

2 3 5 8

* * * *

. . . .

===-

a

= 2 2 2

ACTA TO REFUE DOTA TO REFUE LINCX TO REFUE

12月時時。 2274日—14 保証計解除(1)

中国監督サイズ (mm²)

> ■仏サイズ(cma³) 101-200 201-306

25.68

ST.

5

なる

路位和配と近介 した設定を確認

MARKEL .

及11 出面の決議および発達に対するれる改成解解が開始の句架。 3×10割の保格を指数を注明は5×10間のCTが最高四位と対した。 4週目までに置痛が発達した(図 6 および 7 、表 9)。 これとは対照的に、糠糖芽細胞媒介サイトカイン遺伝子治療を受けた14動物のうち23動物(88%)が、3週間まで腫瘍がなく、 そして8動物(18%)は12週間後も腫瘍がなかった。これらの緑糖芽細胞媒介(1-2治療を受け、腫瘍が増殖した動物は、腫瘍増殖の開始および遺皮が遅れる特徴があった。

(以下余白)

ギル船塔サイズは、4 英国の質に、指導を計画した基礎の総点での値である。	このアールでの3匹のマクスは、計画し位ない政政公国事が発達した。
・対理の配置・	179XIL, #
中月月日祖母子太は、	Col-Legite
	:

1週間後、マウスのコントロール群の平均腫瘍サイズ(最長 および最大幅の離瘍軸の種として副定した)は128mm2であり、 これに比べて、DC/TKIL-2またはLNCX-JL2で形質導入した協議 芽細胞と混合した腫瘍細胞を注射したマウス群では、 それぞ れ 68 および 7mm tであった。 これは、CT26のみまたは未改収線 維芽細胞と混合したCT2%で処理したマウスと比べて、ji-1処 理した動物との間で高度に有意な量(補正x2 - 18.89、p = 0.001) が生じた。4週間後、同じ測定を行うと378.100およ び72am²であった(表11)。 最も発現性の高いベクター、LNC X-|L2は低発現性ベクターDC/TE|L-2よりも実質的により大き な護病発生の阻害を引き起こしたことに注目し得る。腫瘍増 滋の差を評価するために利用した多変量非母数統計手法(19. 20)により、4週間後、図2に示される4群に対する増殖曲線 間で違いが美しく有意である(ec0.001)ことが延期された。 統 いてコントロールのアームと[L-1形質導入線維芽細胞を混合 した腹瘍細胞を受けた動物との比較は、有意な差(P<0.05)を 明らかにした。雑店細胞のみを注射した動物と未改変練検芽 細胞を加えた腫瘍細胞を注射した動物との間の差は有意でな いが、低11-2発現線維芽細胞を受けた動物と高11-2発現線維 芽細胞を受けた動物との間の菱(P = 0.05)は育恵であった。

1×10⁶個の生きている腫瘍細胞と混合した2×10⁶個の改変 練維芽細胞をマクスに注射すると、結果はより等しいものと なった(図8 および9、 および表 1 2 を参照のこと)。 4 週 間後、全てのコントロール動物で腫瘍が発達したのに対し、

8 2 2 2

115 ± 197

DCTk-ILizまたはLXSN-ILixベクターで改変した緑維芽細胞で処 遠した動物のそれぞれ185年よび27%では、7週間後も陰虚が である(実験は継続中)。 さらに劇的なことに、 である。 これらのアーナは、明らかに醤瘍の定費を防ぐ

(以下余白)

312

国場の定義とは、 国場の定義を提出した。 1×10年のに15年間以上記令した。 1×10年のに15年間以上記令した。 1×10年のに15年間以上記令には、10年ののには、12年間のには、12年間のでは、12年間ののには、115年ののには、115年の記載とは使した。

	â	10 MAC 01 2)定者 3 L 8線 字間配	国協の定者および投資に対するの。2次政策指導を開助の結果。 3×10/費の指導子回路を技計はに1×10/費のCT26路線開放と設合した。	611-20180 C10/800C	12 6 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12 12	の台集・日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日本の日	ų	
		200	l.				,		
最低機能と紹介 した経験が開始	쇎	BOY!	全数 国际人 国际外	147	25-180	101-200 201-300	25-jan joj-200 261-300 > 304	> 301	(emm)
6萬萬法。							•		
The state of the s	=	۰	2	50	•	•	~	~	315 4 19
director samp **	2	-	8	80	•	~	-	=	350 ± 100
ACTUAL SAMBARE	=	-	-	33.5	-	-	•	•	7 7 50
XSN-IL 2 1916 F 16125 **	2	-	=	ms	•	~	-	7	133 ± 121
NCK-11.2 80.29 # 10.00.	•	•		332	~	0	٥	•	± •

2 8 2 ≅

44 44 # 윷 ž

<u>~</u>

BB+1X (mm²) 101-200 201-300

23-100

E CONTRACTOR

ž

8

組織組動を配合 した 神化 ...

ころでしる経典をはない

12週回後,。

未改改組織序組品 DCTX-113-RR CT26 HIM DCTX-112-RE BREFRE

数数数

平均国第サイズは、4週間の間に、豊富を計開した最後の時点での指である。

これらのチェイれぞれの1匹のマクスは、計画し等ない質認内国語が発達した。 このトップの3匹のマクスは、計測し得ない限取内母指が発達した。

平均最高々イズは、4割間の同に、騒響を診断した条後の時点での値である。

•

8 ង

追加のコントロールとして、遺伝学的にIL-1を発現するよ うに改変したCT26細胞をマッスに注射した(結果は示してい 1×10⁵個に連するまでのIL-2発現腫瘍細胞のBalb/c への注射では、腫瘍を生産しなかった。しかしながら、 多くの注射では、対応の動物が腫瘍陽伯の遅れを伴っ 果を確証する。 IL-2生産線維芽細胞の効果と11-2生産 題とを比較するために、本発明者らは、DCTK-IL4ベク 敗とを混合した。図10および11、および長18は、 L1改変腫瘍細胞が、腫瘍発生を防ぐのにいくぶん有効 であることを示している。注射の4週間後、処理したア 腱瘍サイズは101mm2であり、これに比べてコントロー 22週間後、1匹の動物(10% では腫瘍がないものはない。別々の実験において、同じ でOCTX-IL 2改変腫瘍細胞で処理した動物に対するデー 比較の目的で含有する。この比較は、DCTK-IL2改変腫 病細胞が、DCTK-IL2改変線維芽細胞と同様の腫瘍定着に対す る効果を有することを示唆する。

(以下余白)

実施例VII(b)

全身的抗腫瘍免疫に対する線維芽細胞媒介サイトカイン遺伝

Balb/cマウス群を、 2.5×10⁵個の放射線照射した腹瘍細胞 の単独で、あるいは2×10⁸個の形質導入または未改変鉄維芽 細胞と茂合した腫瘍部路で免疫し、し道間後、反対の機能に 5×10⁴個の生きた類響網勘で抗原投与した。 これらの結果 (図12および13、および長14)は、放射線照射した腫瘍 細胞および形質導入線維芽細胞を用いた免疫化は、 動物を生 きた腫瘍細胞の抗原投与に対して防御するが、その防御は、 放射線照射した腫瘍細胞単独または未改変線維芽細胞と混合 した放射線照射した腫瘍細胞での免疫化により違収した防御 よりわずかによいのみであることを経過する。

(以下命白)

全分的行政場合の方式では、2×10 間の存存な登録機関では収支をよっています。 マラスは、5×10 間の存存な登録機関では収支をする7日前に、3,5×10 間の数制模型材でな路積が配金機合した3×10 間の複雑手機関でを全した。 、中均風傷サイズ (cms) 5 3 Š 国等サイズ (map) 101-200 201-300 200 i i 8 K î 8 = 154 슢 2 2 此种秘题HCT26年的** 放射統則外層球和路上 设合した船舶序和路 からから いからけん 22週間後.

1

3 E

44 + +

£ £

. E

. .

2 S

= =

- 9

n n

Lた放射期間をT26 DCTX-IL2 報路事組設置

社会的8牙間2 配合

平均延縮サイズは、4当他の窓に、経路を計画した破役の時点での値である。 これらのフェの1 近のマウスは、計劃し得ない配数内隔値が発送した。

動物を、雑雜芽細胞と混合した放射線照射した腫瘍細胞で免 疫化し、2週間後、新鮮な腹瘍細胞で抗原没与した。図14 および15、および表15に示すように、その結果は、放射 線照射した腫瘍細胞と混合したDCTK-(L2改変線機芽細胞が、 放射線照射層像細胞単独、未改変線線楽細胞と混合した放射 株照射膿瘍細胞、またはLNCX改変線維芽細胞と混合した放射 雄艇耐難連続終よりも、続いて起こる帰席の抗原役兵に対し て優れた防御をもたらすことを証明する。7週間後、コント ロール動物の3分の1に比較して、DCTK-ILZ改変線維芽細胞 で処理した10動物のうち7匹(70%) で腫瘍がないままであ る。 4 週間目、平均腫瘍サイズが、 3 つのコントロール群で 180、170、および140mm2であるのに比較して、この群では41 ea²であった。LNCX-112改定線程芽細胞で処理した動物もまた、 次の農事細胞の抗原投与に対して訪問されたが、結果はそれ ほど若しいものではなかった。この群において、 54%の動物が 健康がないまま残っており、そして、4週間目のこの群の平 均履病サイズは86mm²であった。LXSN-1L1改変線維芽細胞で処 理した群中の維癌がない動物数は、その腫瘍が、その開始に おいて若干遅れたが、コントロール群と同様であった。腫瘍 の開始における違いを採掘するのに利用した多変量非母数統 針手法(19,20)により、図15に示す6匹のアームについての 速いは有意(p=0.012)であることが延明された。 それは、 さら に生理会塩水で処理したコントロールのアーム、 および放射

上配のプロトコールと類似の第二のプロトコールにおいて、

鏡照射腫瘍細胞単独、あるいは、未改変またはLNCKペクター 改変線維芽細胞と混合した放射線照射腫瘍細胞を受けたアー ムが、統計的な群を形成したことを示した。 放射線照射腫瘍 細胞と混合した11-1ペクター改変線維芽細胞を受けた8匹の アームにより、第二の異なる統計的な群を形成した。生理会 塩水を注射したコントロールアームと11.2配管塩入糖機準無路 を混合した経療細胞を受けた動物との間の以下の比較は、全 てのベクターについて有意な差を示した(pc0.0%)。

(以下余白)

特表平7-503455 (25)

これらの移果は、サイトカイン遺伝子治療をする手段として、遺伝学的に改変した銀維芽細胞を用いる可能性を延期を防ぐのに優れていることがわかったが、一方、次の遺瘍の抗原投与に対する全身的動情の誘導においては、DCTII-IL2ペクターは、環境与に対する全身的動情の誘導においては、DCTII-IL2ペクターの方がよかった。これらの対照的な効果は、多少驚くべきものであるが、CMTプロモーターは、インビボでは移植後5日で消えるが、一方、TIプロモーターはより長い期間活性を残すという観察により説明し得る。この発見の含む意味は、本願の遺伝子治療法を首尾よく適用するために、形質等もたらずプロモーターを用いなければならないということである。本研究成果から得られたデータは、直接または間接の記述を開係が果を育する全てのサイトカインについて重要なない。

本の見収集から初られたデータは、直接をたけ間段的に記録感効果を育する全てのサイトカインについて言語な意味を包含している。 すらには、本データは、抗腫痛効力が11-2投与量に依存性であることを示唆する。 したがって、より高レベルのサイトカイン分泌をもたらすベクターの複数は、本願の遺伝子治療法の適用に重要な進歩となる。

上記実施例中の括弧内の参考文献番号は、以下の参考文献 リストと関連し、本明結書中に参考として提用されている。

(以下魚白)

が財和団列 は が が が が が が が が が が が が が	4	Str Basel Base	HOLE	MESS IN	25-100	_	最盛サイズ (sma ³) 101-200 201-300	>301	平均量备件イズ(exast)
7週四後:	L								
TO HO-A (* SPACEO)	•	-	-	138	•	7	-	:	245 ± 171
数44和国外CT26年的	2	-	-		•	~	•	-	110 ± 155
东改安排接导超数之现在 した数斜和阻射CT26	•	~	•	318	•	~	-	_	091 ¥ 041
UNCX改成課程李超路と 现在した教育範囲制CT26	8	-	1	*	_	۰	-	-	140 ± 142
LNCK-Lattatatatatatatatatatatatatatatatatata	2	1	•	25	-	-	-	_	EK ± 113
LYSHLO改建的推步机路上 现象 LYSHA的图形CT26	=	-	-	20.	~	۰	~	-	111 ± 145
CCTX-LOCKWITHERS: HR LC-HT-HEPHLT-35	2	-	٠ "	4 02	-	~	•	•	41 ± 75

平均医療サイズは、4週間の四に、医療を計画した最後の時点での値である。 これらの p.cの 1 Eのマクスは、計画し得をい凱旋内隔離が発達した。

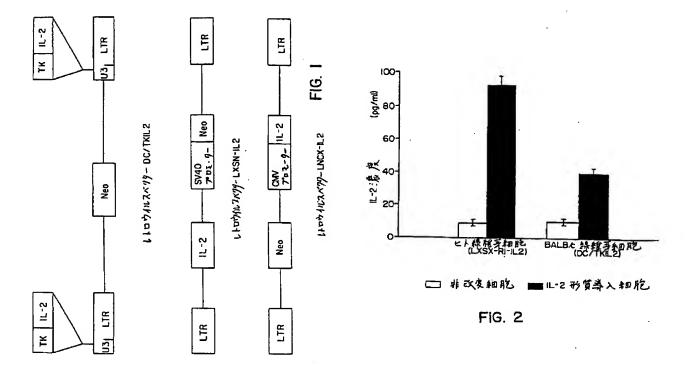
参考去取

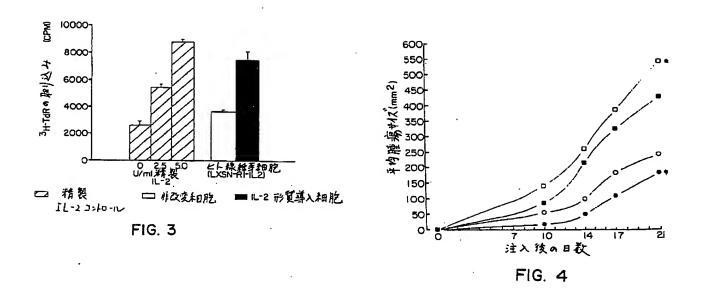
X 1.5

- Gabrilove, J.L. j , Monogr. J. Natl. Cancer Inst. 10:73-7 (1990).
- Kelso, A., Current Opinion in Immunology, 2:215-25 (1989).
- 3. Borden, E.C. 3 , Cancer, 65:800-14 (1990).
- 4. Rosenberg, S.A. ; , Ann. Intern. Ned., 108:853-864 (1988).
- 5. Lotze, H.T. 5 , JAMA, 256:3117-3124 (1986).
- 6. Pixza, G. Ç , Lymphokine Research, <u>7</u>:45-8 (1988).
- 7. Sarna, G. 5 , Journal of Biological Response Modifiers, 2:81-6 (1990).
- Gandolfi, L. 5 , Repato-Gastroenterology, 16:352-6 (1989).
- 9. Bubenik, J. 5 , Immunol. Letters, 12:279-82 (1988).
- 10. Bubenik 5 , Immunol. Letters, <u>21</u>:287-292 (1990).
- 11. Fearon, E.R. \$, Cell, 60:387-403 (1990).
- 12. Gansbacher, B. 5 , J. Exp. Med., <u>172</u>:1217-1224 (1990).
- 11. Watanaba, T. 5, , Proc. Natl. Acad. Sci., 86:9456-9460 (1989).

- 14. Tepper, R.I. ; , Cell, <u>57</u>:503-512 (1989).
- Kriegler, M., Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual, Stockton Press (1990).
- 16. Rosenberg, S.A. ; N. Eng. J. Med., 370 (1990).
- 17. Cornetta, K. 5 , Prog. Nucl. Acid Res. Hol. Biol., <u>16</u>:311-22 (1989).
- 18. Hoover, H.C. 5 , Cancer Res., 44:1671-76 (1984).
- 19. Sobol 5 New Eng. J. Hed. 316:1111-1117 (1987).
- 20. Li Xu, 5 , Virology, 171:331-341 (1989).

本発明を、現在の好ましい実施ย機の参考として記載しているが、本発明の意図から離れることなく様々の改変をなし 得ることが理解されるべきである。したがって、本発明は次のクレームだけに限定される。





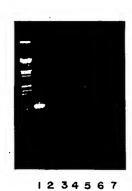
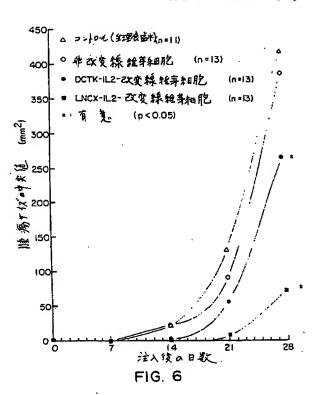
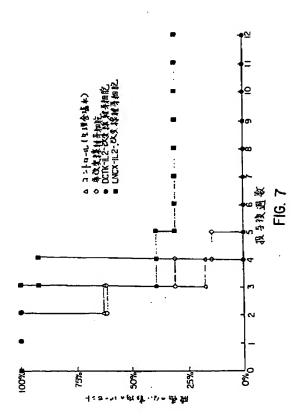
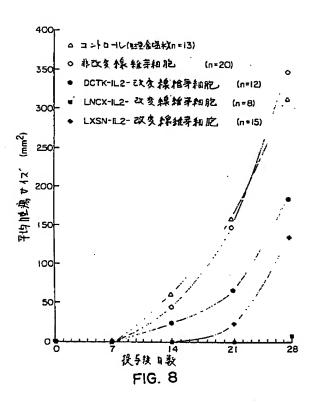
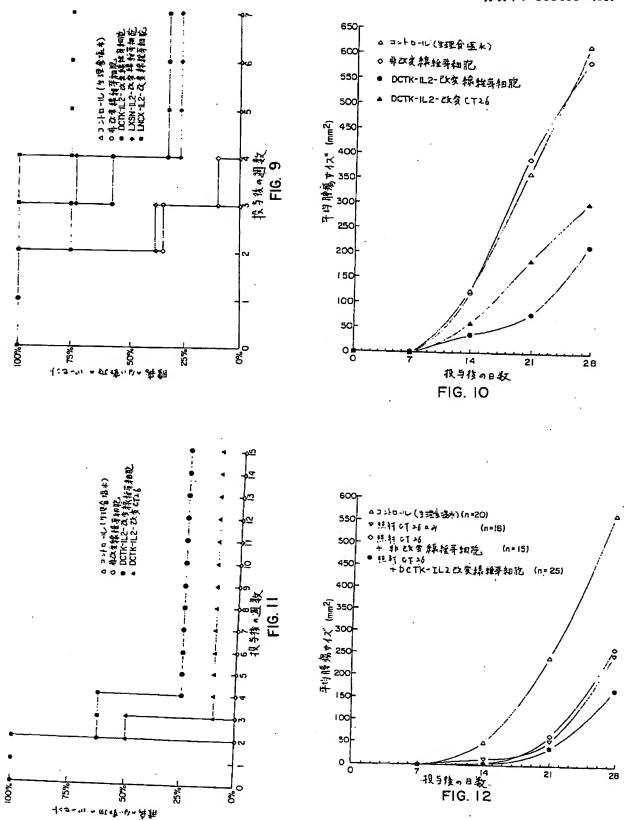


FIG. 5

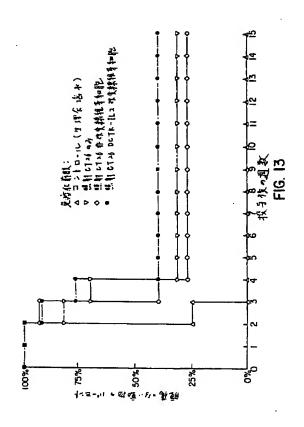


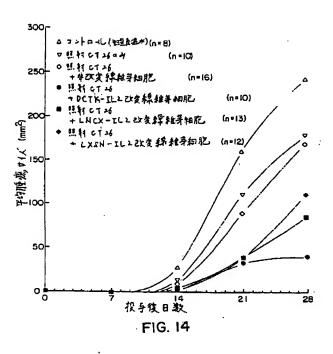


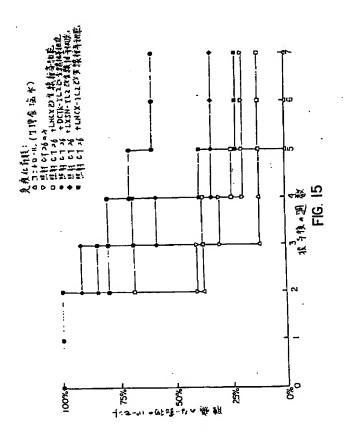




特表平7-503455 (29)







補正書の写し(翻訳文)提出書(特許法第184条の8)

平成8年4月25日

特許庁長官股

1. 特許出版の表示

PCT/US92/08999

癌のリンホカイン遺伝子療法 、

スイート 200, サイエンス パーク ロード 3099

4.代理人

〒840 大阪府大阪市中央区域見一丁目2番27.号 住所

(7828) 弁理士 山本男策

電話 (大阪) 06-949-3910

5 . 補正書の提出年月日

1998年11月29日

- 6. 添付書類の目録
 - (1) 補正者の写し (翻訳文)

The second secon

1 3



頂求の範囲

- 1. 被験体の癌を処置する方法であって、理解性抗原、および、サイトカイン遺伝子産物を発現するように遺伝的に改
 変されたサイトカイン発現細胞を含有する製剤形態で、活動中の腫瘍部位以外の部位において、放被験体を免疫処置する
 ことにより、癌に対する接被験体の免疫応答を刺激する工程
 を包含し、ここで、鉄サイトカイン発現細胞が腫瘍細胞では
 ない、方法。
- 2. 前記放験体からあらかじめ単離された腹痛細胞が、前記離痛性抗原を抵供する、請求項1に記載の方法。
- 3. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターロイキン-2、インターロイキン-3、インターロイキン-4、インターロイキン-6、インターロイキン-6、およびガンマインターフェロンからなる群から選択される、 領求項1に記載の方法。
- 4. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキンー 2 である、請求項 1 に記載の方法。
- 5. サイトカイン発現細胞を生産するために、サイトカイン遺伝子が経換え法により細胞中に転移される、請求項1に記載の方法。
- 6. 前記サイトカイン遺伝子が、発現ベクター中に存在する、精求項5に記載の方法。
 - 7. 前記発現ペクターが、自殺遺伝子をさらに含有する、

インターロイキンー2、インターロイキンー3、インターロイキンー4、インターロイキンー5、インターロイキンー6、およびガンマインターフェロンからなる群から退択される、 請求項11に記載の組成物。

- 13. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-2 である、請求項11に記載の組成物。
- 14. 前記サイトカイン遺伝子が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのには十分に低いレベルで発現される、請求項11に記載の組成物。
- 15. 前記形質導入の工程において、前記レトロウイルス 発現ペクターが、11-2の持続分泌を引き起こすプロモーター を有する、請求項 9 に記載の方法。
- 1.6. 前記レトロウイルス発現ベクターが、 1.日につき10 *個の細胞当たり約2ナノグラムから約160ナノグラムのIL-2の 分泌を引き起こす、請求項1.5 に記載の方法。

請求項6に記載の方法。

- 8. 前記サイトカイン発現細胞が、線維芽細胞および抗原 抵示細胞から生産される、請求項5 に記載の方法。
 - 9. 癌に対する被験体の免疫応答を高める方法であって;
 - a) 該被験体から線維芽細胞を単離する工程;
 - b) インピトロで、鎮線維芽細胞を培養する工程;
- c) レトロウイルス発現ペクター中に、IL-2をコードする遺伝子および腹痛性抗原をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現ペクターを用いて、拡線維芽細胞を形質等入して、旋線維芽細胞により、旋腫瘍性抗原を発現し、そして、旋11-12を発現および分泌する工程:および
- d) 活性環痛部位以外の部位において、免疫応答を高めるのに十分であるが、実質的な全身的毒性を避けるのに十分に低いレベルで11-2を発現し、そして故腫瘍性抗原を発現する鎮線維芽細胞を用いて、接被験体を免疫処置する工器、を包含する、方法。
- 10、前尼線維芽細胞が、自殺遺伝子を発現するように、 きらに改変される、請求項8に記載の方法。
- 1.1. 體瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、該組成物が、腫瘍性抗原、および、サイトカイン遺伝子虚物を発現するように遺伝的に改変されたサイトカイン発現細胞を含有し、ここで、該サイトカイン発現細胞が 腫瘍細胞ではない、組成物。
 - 12. 削記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン~1、

		冽 金	释音	PCT/Layers	
US CL	ASSPICATION OF SURJECT MATTER Prince for State State. :Prince See State State. In International Prince Chapterstone (IPC) or				
A PER	LDE SEARCEED		- Charles	ess DC	
	Committee oursies (chariferens symme	40	(0-1-0-1		
U.E. ;	434738. 93U, 85; 435/240.2. 720.1, 49.5, 6	00.51. 00.52;	93.96F, 32, 12,	57, 70, 71	
Decomands	ton searched other then symbols decembers		Chair Paris de par		in the fisher response
DICISII, I	int has constitut during the asternament so ICEDLECE, APE	art) (many of		oters provinces	, treest styre most
	LINGSHIE CONSTRUMEN TO BE RELEY.				
	Comment of decrees, with higher than	بعددانه سب		-	Reference to claim (4)
¥,	Jurusi of Experimental Medicine, Volume "Secretaria S Gase Transfer Sun Transce Processor Leavesty", pages 1217-1224, on	172, bound C Cirdly Abrugal the angue de-	disher (990, C no Totalpriposis	erstanter at si, dy and federal	1-8, 12-14 9, 28, 23, 26
,	Coll, Velorin 37, board 05 May 1989, Yapp Anti-Tumer Antivity in Vive*, pages 203-01	wa al, "Mari 12. pp the est	m kaarteetde-4 be demands.	Displays Potest	1334 111.1214 4, 13
	Cell, Voterno 60, housed 60 Paircury 1990 Tumor Cells Sypanies T Helper Function is pages 197-600, non-the-mates decreases.	Paren et el de Georgi	. "Implements." so of an Antibe	Production by	1.4.2, (4-15 2.4.2, (4-16
	Conser Research, Volume St., Issued 15 at Constantly Managedistal Phresblate jusy http \$102-\$106, on the enter decaptors.	inguist (570), 6 to as Assistante	Ogoro et al., " r o-laterforce ?	Implementes of Descrip ^a , pages	F16
					!
	r december or limit is the entirement of	_			
	al alarmo of the familiary 				
=		- F			
. =	unit vind der der delte de prinse stages et en 1 delte de publishen det et delte entre et 2 delte de graniste Maria delte et de del deriver, un deldige er	~			<u> </u>
_ =	ر سا جد هن کا ایجیدسا شاه بیدر انظام کا انجید بداری				1
	time completion of the intersectional contrib		mediag of the	6 JAN E	397
No PST	dang selection of the MA/ of Pender and Trademarks D.C. 2021		OUBLING ST	ma AM	bre /
	NOT APPLICABLE		ne pla. (TV)		L /

		PCT/UNISON	**	
C (Common	HINE DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Congress				
¥	Court Arithtels, Volume JS, Issuel 15 Describer (1973, Chaptenber of Vocas-amblised Insurinces Case Transfer into Turn Colp Greature P Losing Assistances Ambasiny*, pages 7823-7825, see the costs decrease		1.3. 3. 6. 1.11.12.14 2.7	
			_	
	·			

	国際網	T W S	ACANTANONA	
A. CLASSIFICATION OF SUBIS	PCT MATTERS			
A41E 4676, 25/12, 39/00, C129	1979, 1934, 1925, 19	26, 15/90, 25/83		
A. CLASSIFICATION OF SUBIR	SET MATTER:			
414938, 97U, 00; 415/200.3, 320	11.00 JEW .EM .I.	725/65, 32, 12, 57, 70, 71		
	•			
			•	
			•	

フロントページの続き

38/21

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, SE), CA, JP (72) 発明者 ロイストン, アイバー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ, エル カミノ デル テアトロ 1515 (72)発明者 フリードマン,シオドアー アメリカ合衆国 カリフォルニア 92037, ラ ホヤ,ラ ホヤ ショアーズ ドライ ブ 9470

(72)発明者 ファクライ, ハピープ アメリカ合衆国 カリフォルニア 92056, オーシャンサイド, アベニダ アンダンテ 1538

FΙ

```
【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載
【部門区分】第3部門第2区分
【発行日】平成12年3月14日(2000.3.14)
【公表番号】特表平7-503455
【公表日】平成7年4月13日(1995.4.13)
【年通号数】
【出願番号】特願平5-507903
【国際特許分類第7版】
 A61K 35/12
          ADU
     31/70
     48/00
// A61K 38/00
     38/21
[FI]
 A61K 35/12
          ADU
```

手统袖正律

平成11年10月13日

特許庁長官 龄

1. 事件の表示

平成5年特許蘇第507903号

31/70 48/00 37/02 37/66

2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国 カリフォルニア 92121、サン ディエゴ. スイート 200. サイエンス パーク ロード 3099 名称 サン ディエゴ リージョナル キャンサー センター

3. 代理人

住所 〒540-6015 大阪府大阪市中央区域見一丁目2番27号 クリスタルタワー15階

氏名 (7828) 井理士 山本 芳策

電話 (大阪) 06-6949-3910

4. 補近対象容額名

研求の範囲および明知管

5. 韓正対象項目名

苗状の範囲および明和書

6. 補正の内容

- 6.1 陰水の無用を別紙のとおり補正します。
- 6.2 明甜書を以下のとおり補正します。

6.2.1 明顯音第4.5頁~第5.0頁に記載の表5を削除します。

遊求の範囲

1. 腫瘍性抗原に対する被験体の免疫応答を高める組成物であって、貧組成物 が、脳痛性就原、および、少なくとも1弦のサイトカイン遺伝子室物を発現する ように遺伝的に改変された<u>サイトカイン発現制度(CE</u>制<u>配)を合有する</u>、組成

2. 前記サイトカイン遺伝子が、インターロイキン-1、インターコイキン-2、インターロイキンー3、インターロイキンー4、インターロイキン…5、イ ンターロイキンーも、およびガンマインターフェロンからなる罪から選択される。 結成項<u>1</u>に記載の組成物。

3. 少なくとも1種のサイトカイン遺伝子が、インターロイキンー2である。 請求項<u>1</u>に配載の組成物。

4. 各サイトカイン遺伝了が、免疫応答を刺激するのに十分であるが、実質的 な全身的等性を避けるのには十分に長いレベルで発痕される、請求項1に記載の 组成物。

5. 贈瘍細胞が、前記贈瘍性抗原を提供する、請求項1に記録の組成物。

6. 前記サイトカイン遺伝子変物が、発現ベクターから発現される、請求項1 に記載の組成物。

7. 前記発度ベクターが、自殺遺伝子を含有する、請求項6に記載の組成物。

8. 前記CE割削が、線維芽細胞から生産される、欝泉項1に配数の組成物。

9. 前記CB和限が、抗原提示額配から生産される、請求項1に記載の組成物。

- 19. 猫の治療として免疫験体の免疫応答を刺激する変物の函数における、射球 項1から9のいずれか1項に正義の組成物の使用。
- 11. 無に対する治域数体の免疫広告を刺激するための薬物として使用するため の組成物の調製方法であって:
- a) 鉄窓被験体から募除芽細胞を単離する工程:
- h) インビトロで、鉄線維芽組度を培養する工程;
- __s) インターロイキンー 2をコードする遺伝子を含有するレトロウイルス発現 ベクターを用いて、質報維芽期度を形質導入して、CE 新設を選生する工程:
- d) 該癌被験体から風容額胞を単純する工程:
- e) 減圧病細胞の単細胞腫和液を開動する工程;
- ____() 該理協総数が増殖する能力を順言する英府を用いて、該理協総数を処理する工格;および
- R〉鼓CE相像および核処理された順係御数を含有する組成物を処方する工程、 を包含する、方法。
- 12. 前配レトロウイルス発売ペクターが、日祝遺伝子を含有する。 博弈項11 に記載の方法。
- 13. 前配レトロウイルス発現ベクターが、インターコイキンー2の持銭分割を 引き起こすプロモーターを含有する、誇求項11に配載の方法。
- 14. 所配レトロウイルス発送ペクターが、少なくとも4単位/日のインターロ イキンー2の分泌を引き起こす、簡求項11に配載の方法。

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:
☐ BLACK BORDERS
☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
☐ FADED TEXT OR DRAWING
☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
GRAY SCALE DOCUMENTS
LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
\square REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

☐ OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.